Modelluntersuchungen über die Bildung von Lysinoalanin bei Hitzebehandlung von Proteinen

Anna Barbara Holstein

1979

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. H. Erbersdobler

Modelluntersuchungen über die Bildung von Lysinoalanin bei Hitzebehandlung von Proteinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Anna Barbara Holstein
aus
Hamburg

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. H. Erbersdobler
Korreferent: Prof. Dr. Dr. hc. L. Kotter

Tag der Promotion: 27. Juli 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Besprechung der Literatur	3
2.1.	Proteinschädigung bei der Erhitzung	3
2.2.	Lysinoalanin Entdeckung, Chemismus der Bildung	7
2.2.1.	Entdeckung des Lysinoalanins	7
2.2.2.	Chemismus der Lysinoalaninbildung	9
2.3.	Bestimmung von Lysinoalanin	14
2.3.1.	Ionenaustauschchromatographie	14
2.3.2.	Dünnschichtchromatographie	15
2.3.3.	Elektrophorese	16
2.3.4.	Gaschromatographie	16
2.4.	Ernährungsphysiologische und toxikologische Konsequenzen	17
2.4.1.	Stoffwechsel und Ernährungsphysiologie des Lysinoalanins	17
2.4.2.	Toxikologie des Lysinoalanins	19
2.4.3	Verminderung der Bildung von Lysinoalanin	19
3.	Eigene Untersuchungen	24
3.1.	Untersuchungsmethoden	24
3.1.1.	Rohnährstoffanalysen	24
3.1.2.	Bestimmung der Trockensubstanz	24
3.1.3.	Vorbereitung der Proben für die Aminosäurenanalyse	24
3.1.4.	Neuentwicklung einer Bestimmung von Lysinoalanin mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie	25
3.2.	Untersuchungsmaterial	29
3.3.	Ergebnisse	30

Seite

3.3.1. Untersuchungen über die Freisetzung des Lysinoalanins bei der Säurehydrolyse von Proteinen 30

3.3.1.1. Einfluß der Hydrolysendauer auf die Freisetzung von Lysinoalanin 30

3.3.1.2. Einfluß der Normalität der zur Hydrolyse verwendeten Salzsäure auf die Freisetzung von Lysinoalanin 32

3.3.2. Einflüsse und Bedeutung verschiedener Faktoren auf die Bildung von Lysinoalanin 32

3.3.2.1. Auswirkungen des pH-Wertes und der Erhitzungstemperatur auf die Bildung von Lysinoalanin und die Konzentrationen anderer Aminosäuren 32

3.3.2.1.1. Untersuchungen an isoliertem Sojaprotein; Erhitzung 24 Stunden bei 110°C 32

3.3.2.1.2. Untersuchungen an Säurekasein; Erhitzung 24 Stunden bei 110°C 35

3.3.2.1.3. Vergleich der pH-Wert-abhängigen Lysinoalaninbildung in isoliertem Sojaprotein und Säurekasein; Erhitzung 24 Stunden bei 110°C 37

3.3.2.1.4. Erhitzung von Säurekasein bei 90°C (24h) 37

3.3.2.1.5. Erhitzung von Säurekasein bei 70°C (24h) 40

3.3.2.1.6. Zusammenfassender Vergleich der Lysinoalaninbildung im Säurekasein bei den unterschiedlichen Temperaturen 40

3.3.2.2. Untersuchung der Lysinoalaninbildung in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer 43

3.3.2.3. Einfluß des Wassergehaltes auf die Entstehung von Lysinoalanin 43

3.3.2.4. Gegenüberstellung der Lysinoalaninbildung bei offener und bei geschlossener Erhitzung 46

		Seite
3.3.2.5.	Auswirkung der zur pH-Wert-Einstellung verwendeten Substanzen NaOH, Na_2CO_3 bzw. $NaHCO_3$ auf die Lysinoalaninbildung	49
3.3.2.5.1.	Proben mit gleichem pH-Wert	49
3.3.2.5.2.	Proben, denen jeweils die gleichen Mengen Natrium zugegeben wurden	49
4.	Diskussion	54
5.	Zusammenfassung	65
6.	Summary	67
	Literaturverzeichnis	69
	Lebenslauf	

1. Einleitung

Industrielle Aufbereitung von Nahrungs- und Futtermitteln, ebenso wie deren Zubereitung im Haushalt, erfordert in den meisten Fällen die Erhitzung der Produkte, dies zudem oft in alkalischem Milieu. Bei Untersuchungen von Proben unterschiedlicher Art und Herkunft wurde immer wieder festgestellt, daß nach Hitze- und Alkalibehandlung in Proteinen Veränderungen in deren Struktur auftreten, die bis zur irreversiblen Denaturierung ablaufen können. Die Tatsache, daß hieran Lysinreste beteiligt sein könnten, wurde dabei schon relativ früh entdeckt (78,79).

Eine dieser Reaktionen führt zu einer Quervernetzung der ε-Aminogruppe des Lysins mit Dehydroalanin, das seinerseits besonders bei Erhitzung im alkalischen Bereich durch β-Elimination aus Cystin und/oder Serin gebildet wird. Bei dieser Querspange zwischen zwei Proteinsträngen oder innerhalb des Moleküls handelt es sich um eine neue Aminosäure (N^{ε}-(2-amino2-carboxyäthyl)-L-Lysin), die Lysinoalanin genannt wurde. Dieses Lysinoalanin - schon Mitte der 60er Jahre entdeckt - ist gerade in der letzten Zeit in der Öffentlichkeit stark diskutiert worden, da es bei Ratten Schädigungen an den Epithelzellen der Nierentubuli verursacht. Zahlreiche Untersuchungen in der Folgezeit zeigten, daß dieses Produkt der Nahrungstechnologie weit verbreitet ist und in manchen Nahrungs- und Futtermitteln sehr hohe Konzentrationen erreicht.

Für die vorliegende Arbeit war es mir zur Aufgabe gestellt worden, an Modellgemischen zu untersuchen, welche Faktoren die Bildung von Lysinoalanin beeinflussen können. Da ein bereits bestehendes Programm zur Aminosäurenanalyse nach dem Ionenaustauschverfahren für den Lysinoalaninnachweis ungeeignet war, mußte zunächst eine spezifische Analysenmethode

entwickelt werden. Gleichzeitig wurde die für die Bestimmung der Aminosäuren notwendige Hydrolyse im Hinblick auf die Normalität der verwendeten Salzsäure und die Hydrolysendauer überprüft. Im Anschluß daran wurden die Modelluntersuchungen zur Lysinoalaninbildung unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

2. Besprechung der Literatur

2.1. Proteinschädigung bei der Erhitzung

Bei Einwirken von Hitze auf Proteine kommt es in Abhängigkeit von Höhe und Dauer der Erhitzung zu Veränderungen in den Eiweißstoffen. Diese sind zum Teil erwünscht, da hieraus bestimmte Vorteile resultieren können, wie z. B. die durch Keimarmut bedingte höhere Haltbarkeit der Produkte. Die Verdaulichkeit wird durch eine Inaktivierung verschiedener Enzyminhibitoren und gleichzeitig durch die Hitzedenaturierung, die zusätzliche Angriffsmöglichkeiten für Proteasen schafft, verbessert. Durch Bildung von Aromastoffen wird die Schmackhaftigkeit erhöht. Im Zusammenhang mit alkalischer Behandlung werden bestimmte technische Eigenschaften wie Quellfähigkeit, Wasserbindung, Emulgierung oder Stabilisierung, Schaumbildung, Verspinnbarkeit (Texturierung) usw. erreicht.

Auf der anderen Seite können jedoch durch derartige Manipulationen Minderung des Nährwertes eintreten oder sogar schädliche Substanzen entstehen. Bei hohen Temperaturen (über 100°C) treten Aminosäurenzerstörungen auf. Besonders anfällig gegenüber Hitze ist das Cystin; es wird unter Freiwerden von Schwefelwasserstoff zersetzt (1). Aber auch neue Verbindungen können gebildet werden. So treten zwischen den sauren Aminosäuren und ihren Amiden Imidbindungen auf; die Hydroxylgruppen von Threonin und Serin reagieren mit funktionellen Carboxylgruppen (51,52).

Die Kondensation der ε-Aminogruppe des Lysins mit der freien Carboxylgruppe der Monoaminodicarbonsäuren führt unter Abspaltung von Ammoniak zum Entstehen von N^{ε}-(γ-L-glutamyl)-L-Lysin, Glutamyllysin (67 , 10) bzw. N^{ε}-(β-L-aspartyl)-L-Lysin, Aspartyllysin (4 , 62).

Die Erhitzung von Proteinen in alkalischem Milieu bewirkt schon bei niedrigeren Temperaturen deren Veränderung. Peptidbindungen werden hydrolysiert. Durch hydrolytische Abspaltung der Guanidinogruppe des Arginins entsteht Ornithin (97). Die Aminosäuren Cystin, Cystein, Serin, Arginin, Threonin werden teilweise zerstört (97,20,70). Durch Racemisierung treten zum Teil nicht mehr zur Proteinsynthese nutzbare oder sogar unverträgliche D-Aminosäuren auf (20, 68).

In einer weiteren, sehr wichtigen Reaktion kommt es zur Bildung von Dehydroalanin (α-Aminoacrylsäure). Es entsteht nach β-Elimination entweder der Disulfidbindung von Cystin (Cystein) (13,5) oder der o-glykosyl-(o-phosphoryl)-Gruppen von Serin (49). Aus Threonin wird nach β-Elimination β-Methyl-Dehydroalanin (89). Die Vinylbindung dieser Produkte ist durch ihr ungesättigtes C-Atom sehr reaktionsfähig. So kann es zu Additionsreaktionen kommen zwischen dem Dehydroalanin und der ε-Aminogruppe des Lysins. Hierbei entsteht Lysinoalanin (65,13,96). Dehydroalanin bildet mit der δ-Aminogruppe des Ornithins Ornithinoalanin (97), mit proteingebundenem Cystein Lanthionin (45,6,87). Mit Ammoniak, das bei der Peptidhydrolyse mit Alkali frei wird oder bereits in dem verwendeten Lösungsmittel vorliegen kann, reagiert Dehydroalanin zu β-Aminoalanin (3). Auch zwischen Dehydroalanin und anderen eventuell frei vorliegenden Gruppen (z. B. freie und amino-endständige Aminosäuren) kommt es zu Wechselwirkungen. Eine zusammenfassende Übersicht hierzu gibt Asquith and Otterburn (1977)(6).

Werden Proteine in Anwesenheit von Kohlenhydraten erhitzt, so kommt es mit reduzierenden Zuckern zur sogenannten Maillard-Reaktion oder Nicht-enzymatischen Bräunung. Betroffen ist wieder hauptsächlich die freie ε-Aminogruppe des Lysins. In Gegenwart von Glukose oder Laktose bildet sich ε-Fruktoselysin bzw. Laktuloselysin (22 , 24 ,16). Diese

Substanz ist bei der salzsauren Hydrolyse, zur Vorbereitung für die chromatographische Aminosäurenanalyse, nicht stabil. Sie wird nachgewiesen über ihre zwei dabei entstehenden Folgeprodukte: das Furosin, ein Lysinderivat des Acetylfurans, und über das Pyridosin (ε-(1,4-Dihydro-6-methyl-3-hydroxy-4-oxo-1-pyridyl)-L-Lysin (22,23,44,31,32).

Aminosäurenverluste und das Auftreten von sogenannten Maillardprodukten bei Ablauf der Nicht-enzymatischen Bräunung werden bereits nach dem Einwirken geringer Temperaturen(ab 50°C)ebenso wie nach länger dauerndem Lagern von Lebensmitteln beobachtet. Mit Hilfe der Indikatoren Furosin und Pyridosin wurden daher die Lysin-Glukose (oder -Laktose) Reaktionen in vielen Nahrungsmitteln, vor allem auch verschiedenen Milchprodukten, nachgewiesen (26). Neben schonender Herstellung wirkt sachgemäße Handhabung während des Aufbewahrens (kühl und trocken) dieser Nährwertminderung entgegen (25).

Außer dem Lysin sind endständige oder frei vorliegende Aminosäuren, deren α-Aminogruppe also nicht durch eine Peptidbindung geschützt ist, auf ähnliche Weise reaktionsfähig. So kann es unter anderem zur Bildung von Fruktose-Methionin oder Fruktose-Glycin kommen (15).

Eine Erhitzung von Proteinen mit Fetten bedingt eine weitere Verschlechterung der Eiweißqualität. Fette und Öle können schon bei Raumtemperatur spontan mit Luftsauerstoff reagieren, das heißt zu Peroxidradikalen autoxidieren. In einer Folge von Reaktionen entstehen hieraus unter anderem Hydroperoxide, Aldehyde, sekundäre Alkohole, Ketone, Epoxide oder, bei Einfluß höherer Temperaturen, Oxypolymere. Von diesen Verbindungen werden beim Erhitzen mit Proteinen Epoxide, Aldehyde und vor allem Carbonylverbindungen an verschiedene Aminosäuren gebunden. Zwischen der Carbonylgruppe

des Fettes und der Aminogruppe des Proteins oder auch zwischen dem Carbonylsauerstoff des Proteins und der Hydroxy-(Hydroperoxy-)gruppe des oxidierten Fettes treten Quervernetzungen, wahrscheinlich durch Wasserstoffbrücken, auf. Zusätzlich wird wieder, besonders bei hohen Temperaturen, die ε-Aminogruppe des Lysins blockiert. Veränderungen der schwefelhaltigen Aminosäuren führen zum Auftreten von Cysteindisulfoxid, Cysteinsäure und Methioninsulfoxid (84). Näheres über die Art dieser Umsetzungen sowie deren physiologische Bedeutung siehe bei Weber(1972) (88).

2.2. Lysinoalanin
Entdeckung, Chemismus der Bildung

2.2.1. Entdeckung des Lysinoalanins

Im Jahre 1964 wurde von Patchornik und Sokolowski (65), Bohak (13) sowie Ziegler (96) über das Auftreten einer bisher unbekannten basischen Aminosäure berichtet, die sich offensichtlich nach Alkalibehandlung von Proteinen bildete.

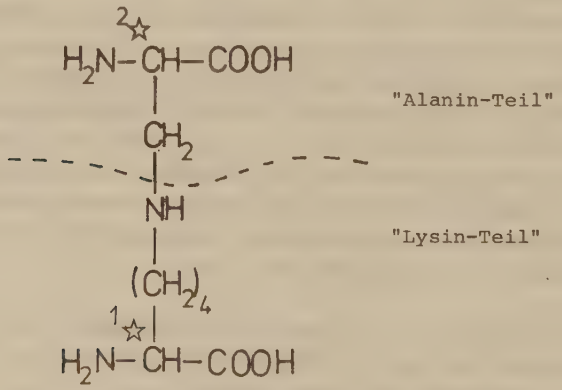
Als erste wiesen Patchornik und Sokolowski das Phänomen zunächst im sauren Hydrolysat dinitrophenylierter, reduzierter Ribonuclease (S-DNP-RNase) nach. Dabei wurde die neue Verbindung bei der Ionenaustauschchromatographie kurz vor dem Lysin eluiert. Die Beurteilung der übrigen, im selben Hydrolysat erscheinenden Aminosäuren zeigte, daß von ursprünglich 10 Mol Lysin nur noch 6,5 Mol und von 8 Mol Dehydroalanin noch 5,5 Mol nachzuweisen waren. Die Autoren folgerten, daß die entdeckte Verbindung als Ergebnis einer Reaktion der ε-Aminogruppe des Lysins mit dem aus Cystin entstandenen Dehydroalanin auftritt. Offensichtlich hatten bei der Alkalieinwirkung auf die RNase die ungeschützten ε-Aminogruppen von drei Molekülen Lysin zusammen mit drei Molekülen Dehydroalanin die neue Substanz gebildet. Als Name für diese Aminosäure wurde zunächst Lysalanin, abgekürzt LAL, vorgeschlagen (65).

Auch Bohak veröffentlichte 1964 seine Resultate über die Untersuchungen von alkalibehandelter Ribonuclease (13). Nachdem das Enzym bei 40°C zwei Stunden lang 0.2N NaOH (pH-Wert des Gemisches: 13) ausgesetzt war, ergab, nach salzsaurer Hydrolyse, die Säulenchromatographie folgende Analysendaten:
Lysin: von 10 im Nativ-Protein vorhandenen Resten noch 6,
Cystin: von 8 Mol in der unbehandelten RNase noch ein Molekül.

Außerdem trat eine bis dahin unbekannte basische Aminosäure auf. Diese Verbindung präsentierte Bohak nach weiteren Versuchen als N^{ε}-(D-L-2-amino-2-carboxy-äthyl)-L-Lysin. In Übereinstimmung mit Patchornik wurde hierfür der von Dr. J.S. Fruton (Yale Universität) vorgeschlagene Trivialname L y s i n o a l a n i n , abgekürzt L A L , gewählt.

Isoliert wurde LAL von Bohak aus dem Ribonuclease-Hydrolysat nach dessen chromatographischer Fraktionierung. Durch Oxidation mit Perjodat und anschließende Identifizierung der Abbauprodukte (Lysin, Ammoniak und Formaldehyd) wurde seine Struktur aufgeklärt:

Abbildung 1: Struktur von Lysinoalanin, $C_9H_{19}N_3O_4$, MG: 233



Auskunft über die Konfiguration an den beiden asymmetrischen C-Atomen ($\overset{\star}{C}_1$, $\overset{\star}{C}_2$) gab einmal die Umsetzung des aus der Perjodat-Reaktion mit LAL entstandenen Lysins mit L-Lysin-Decarboxylase. Dabei wurden 98 % des Lysins decarboxyliert, hatten also in der L-Form ($\overset{\star}{C}_1$) vorgelegen. Die räumliche Anordnung am zweiten asymmetrischen C-Atom ($\overset{\star}{C}_2$) wurde mit Hilfe von L- bzw. D-Aminosäureoxidase untersucht (71). Hiernach ergab sich, daß das asymmetrische "Alanin"-Zentrum racemisch entweder die L- oder die D-Form einnahm. Damit trat Lysinoalanin nach der beschriebenen Behandlung der Ribonuclease diastereomer in der L-L oder in der L-D Konfiguration auf.

Bohak synthetisierte die neue Verbindung durch Addition von N^{α}-Carbobenzyloxy-L-Lysin an die Doppelbindung von N-Phenylacetyldehydroalanin. Das Produkt hieraus war mit dem Isolat chromatographisch identisch. Außer in RNase wies Bohak LAL auch in alkalibehandeltem Rinderplasmaalbumin, in Lysozym, Chymotrypsinogen und Phosvitin nach. Er nimmt an, daß es durch Addition einer Aminogruppe des Lysins an Dehydroalanin, das nach β-Elimination gebildet wird, entsteht.

Von Ziegler wurde 1964 Lysinoalanin in Wolle, die Alkali ausgesetzt bzw. mit Dampf behandelt worden war, gefunden (96). Okuda und Zahn gelang im selben Jahr die Synthese der Aminosäure analog ihrem Entstehungsmechanismus, ausgehend von einem Acrylsäurederivat (61).

2.2.2. Chemismus der Lysinoalaninbildung

Schon Patchornik und Sokolowski postulierten, daß Lysinoalanin in S-DNP-RNase durch Reaktion einer ε-Aminogruppe des Lysins mit Dehydroalanin, das in ihren Untersuchungen durch β-Elimination aus Cystin entstanden war, gebildet

wird (65). Unterstützend zeigte Bohak, daß in Ribonuclease, die unterschiedlich lang mit Alkali behandelt wurde, die Menge an Cystin schnell abnahm. Gleichzeitig wurden Dehydroalaninreste gebildet, die nach einstündiger Hydrolyse bei 100°C als Pyruvat nachgewiesen wurden (64).

Um miteinander zu reagieren, müssen Cystin und Lysin im Protein benachbart sein. In alkalibehandelter S-DNP-Ribonuclease verbanden sich zum Beispiel die Lysinreste 41 und 66 mit Dehydroalanin aus den direkt daneben liegenden Cystin-Resten 40 bzw. 65, zu LAL (65). So fand auch Bohak, daß in Chymotrypsinogen, in dem zwei Cys-Lys Sequenzen vorkommen, zwei LAL entstehen können, wohingegen alkalische Behandlung von Pepsinogen, in dem die Hauptmenge der Lysinreste weit vom Cystin-Anteil des Moleküls entfernt ist, kein Lysinoalanin ergibt (13). Andererseits wird in S-DNP-RNase ein drittes Molekül LAL gebildet, offenbar durch Reaktion der in der Aminosäuresequenz weit auseinander liegenden Reste Lysin 1 mit Cystin 110. In diesem Fall muß die räumliche Anordnung innerhalb der Tertiärstruktur des Proteins günstig für die Ausbildung einer LAL-Querbrücke gewesen sein. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der sterischen Nachbarschaft der Reaktionspartner zueinander, ist die Tatsache, daß im Lysozym aus Hühnereiweiß, das nur eine Cys-Lys Sequenz enthält, nach entsprechender Behandlung drei Moleküle LAL nachgewiesen werden (13).

Dehydroalaninreste entstehen aber nicht allein aus Cystin bzw. Cystein. Auch aus β-Elimination von Serylresten resultiert das ungesättigte Zwischenprodukt. Bohak fand in Phosvitin nach dessen Alkalibehandlung fast 80 % der vorhandenen Lysinreste zu der neuen Verbindung umgewandelt, obwohl Phosvitin weder Cystin- noch Cysteinreste enthält. Es ist jedoch reich an Phosphoserylresten. Aus Phosphoseryl- bzw. Serylresten wird bei Laugen-(Hitze-)Einwirkung durch

β-Elimination Dehydroalanin gebildet (60 , 53 , 63 , 49 , 35). Dies ist zum Beispiel durch dabei auftretende Veränderungen in der UV-Absorption nachzuweisen. Dehydropeptide, einschließlich solcher, die Dehydroalanin enthalten, haben ein charakteristisches UV-Absorbtionsspektrum mit einem Maximum bei 240 nm (18).

Abbildung 2: Bildung von Dehydroalanin aus Serin- und Cystin- (Cystein-)Resten

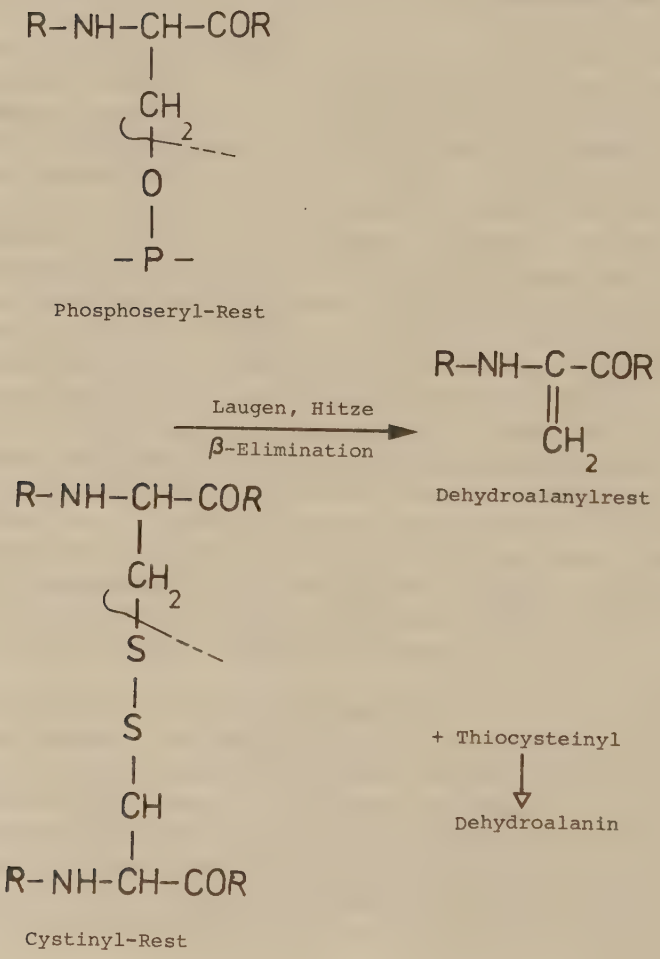
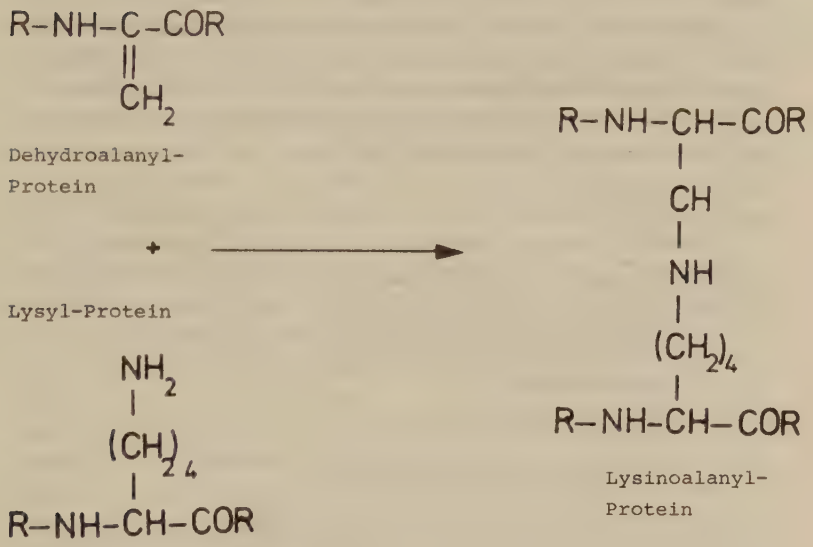


Abbildung 3: Bildungsschema N^{ε}-DL-(2-amino-2-carboxyäthyl)-L-Lysin aus Dehydroalanin und Lysin



Durch das Vorhandensein zweier asymmetrischer Zentren kann Lysinoalanin in vier verschiedenen stereochemischen Anordnungen vorkommen. Hierüber sowie über das Auftreten (tatsächlich oder hypothetisch) weiterer Quervernetzungsprodukte aus Dehydroalanin und anderen Aminosäuren sei auf M. Friedman (37) verwiesen.

2.3. Bestimmung von Lysinoalanin

Außer in zwei Antibiotika, Cinnamycin und Duramycin (41), ist Lysinoalanin bisher in der Natur weder in gebundener noch in freier Form gefunden worden. Nach der Entwicklung entsprechender Nachweismöglichkeiten für LAL stellte man jedoch fest, daß es aufgrund seines Entstehungsmechanismus nach Einwirken von Alkali oder Hitze auf Proteine, vor allem in Nahrungs- und Futtermitteln weit verbreitet vorkommt (81).

Folgende Verfahren finden zu seiner Bestimmung Anwendung:

2.3.1. Ionenaustauschchromatographie
2.3.2. Dünnschichtchromatographie
2.3.3. Elektrophorese
2.3.4. Gaschromatographie

2.3.1. Ionenaustauschchromatographie

Nachdem zunächst an natürlich vorkommenden Stoffen (Mineralien, Stärke) getrennt wurde, entdeckten Adams und Holmes (1934 - 1938) die ionenaustauschenden Eigenschaften von Kunstharzen. Als es gelungen war, in ein vernetztes Polystyrolharz Sulfonsäure als Ankergruppen einzubauen, setzte man Polymerisationsprodukte ein. Eine Übersicht hierzu gibt H. Petry 1967(66). In der Aminosäurenanalytik führten weitere Untersuchungen zur Verfeinerung der Technik (54, 55, 56, 57, 58) und 1958 zum ersten automatischen säulenchromatographischen Ionenaustauschverfahren.

Das System, mit dem auch Bohak erstmals Lysinoalanin nachwies (77), bestand aus zwei Säulen. An der ersten Säule, Ausmaße 150 x 0,9 cm, gefüllt mit dem sehr feinmaschigen Polystyrolharz Amberlite IR-120, 8 % vernetzt, wurden die sauren und neutralen Aminosäuren mit zwei Pufferlösungen,

pH 3.25 und 4.25, beide O.2N, bei 50°C getrennt. Die Analyse der basischen Aminosäuren einschließlich des Lysinoalanins erfolgte mit Hilfe einer kleineren Säule (15 x 0,9 cm, Harz wie oben). Hierzu wurde bei 50°C ein Natrium-Citrat-Puffer mit pH 5.28, O.38N, verwendet. Die Messung der Aminosäurenkonzentration erfolgte automatisch (76) nach der Ninhydrinmethode (74 ,4O). Die vollständige Aminosäurenanalyse eines Proteinhydrolysates dauerte auf diese Weise fast einen Tag.

In den folgenden Jahren wurden Veränderungen in bezug auf die Säulenhöhe, das Harz, Elutionstemperaturen, Pufferanzahl- und Zusammensetzung vorgenommen (73 ,2O ,43). Heute gelingt, im sogenannten Einsäulenverfahren (75 ,19) eine komplette Aminosäurenanalyse der verschiedensten Hydrolysate in ein bis drei Stunden (27).

Bei der Ionenaustauschchromatographie wird, wie bereits erwähnt (s. S.7), das LAL kurz vor dem Lysin eluiert. Dies erklärte Bohak damit, daß der aufgrund der LAL-Dissoziationskonstanten kalkulierte isoelektrische Punkt (I.P.) der Substanz (pH 7.7) niedriger ist als der I.P. des Lysins (pH 9.5) (13).

2.3.2. Dünnschichtchromatographie

Sternberg und Kim (8O) verwendeten Celluloseplatten sowie ein Laufmittelgemisch aus 1-Butanol-Ameisensäure-Wasser im Verhältnis 23:4:5. Insgesamt drei Läufe der zu messenden Hydrolysate und anschließendes Trocknen der Platte ergab die Konzentration der fraglichen Komponenten nach spectrodensitometrischer Messung der mit Ninhydrin behandelten "Spots". Mit dieser Methode wurden LAL-Untersuchungen in Kasein, Soja-Protein, Ei-Klar, jeweils nach Hitze und Alkalieinwirkung, vorgenommen. Außerdem wurde auf diese Weise eine

große Anzahl von kommerziell hergestellter Nahrung und von Nahrungsmittelbestandteilen auf ihren LAL-Gehalt überprüft. Die Nachweisgrenze für LAL lag bei 12 bzw. 6 (abhängig von der aufgetragenen Menge Proteinhydrolysat) µg/g Protein (ppm). Die Resultate der Lysinoalaninbestimmung in alkalibehandeltem isoliertem Soja-Protein nach der Dünnschichtchromatographie waren mit denen durch Ionenaustauschchromatographie erhaltenen vergleichbar.

2.3.3. Elektrophorese

Asquith et al. (3) bestimmten das Lysinoalanin mit Hilfe der Elektrophorese nach der Methode von Atfield und Morris (7). Teile von Hydrolysaten alkalibehandelter Proteine wurden zusammen mit LAL-Standard auf Chromatographiepapier aufgetragen und 1,5 Stunden bei 10°C mit 75 V/cm einer Puferlösung mit pH-Wert 5.2 ausgesetzt. Aus dem anschließend getrockneten und mit Kadmium-Ninhydrin-Lösung behandelten Papier wurden die Flächen, die dem Standard- bzw. Proben-LAL-Gehalt entsprachen, ausgeschnitten, mit Methanol eluiert und bei 500 nm photometriert.

2.3.4. Gaschromatographie

Mit Hilfe der Gaschromatographie isolierte A.H. Whiting (90) Lysinoalanin aus dem Protein-Polysaccharid-Komplex alkalibehandelten Knorpels. Die für diesen Nachweis hergestellten flüchtigen Derivate der Aminosäure waren N-Trifluoracetylester, deren Konzentration in einem kombinierten Gaschromatograph-Massenspektrometer (L K B 9000) ermittelt wurden.

2.4. Ernährungsphysiologische und toxikologische Konsequenzen

2.4.1. Stoffwechsel und Ernährungsphysiologie des Lysinoalanins

Wie bereits gezeigt wurde, entsteht Lysinoalanin in Proteinen aus der Reaktion von Lysin- mit Dehydroalaninresten, die ihrerseits nach β-Elimination unter anderem aus der Spaltung von Cystin gebildet werden können. Hieraus geht hervor, daß viele Nahrungs- und Futtermittel, in denen nach entsprechender Behandlung LAL auftritt, in ihrem Nährwert gemindert sind, da oft gerade Lysin und Cystin in bezug auf den Aminosäurengehalt der Nahrung limitierend sind. Bei Ratten wurde in Fütterungsversuchen gezeigt, daß mit dem Anstieg der Lysinoalaninkonzentration im Futter eine verminderte Futteraufnahme (21) sowie eine Abnahme der Nettoproteinutilisation einhergingen (20).

Mit steigendem Anteil an Quervernetzungen im Protein können Peptidbindungen immer weniger von abbauenden Enzymen angegriffen werden (33). Bei unterschiedlich hohem Gehalt an proteingebundenem LAL in Rattenrationen ergab sich, daß davon umso weniger aus dem Proteinverband freigesetzt, d.h. verdaut werden konnte, je höher seine Konzentration war (21). Proteingebundenes LAL wird somit hauptsächlich über den Kot ausgeschieden (21) bzw. in gewissem Maße durch die intestinale Mikroflora abgebaut (33). Freies Lysinoalanin, das entweder der Ration zugegeben oder durch Hydrolyse aus dem Proteinverband gelöst worden war, gelangt dagegen nach oraler Gabe in der Hauptsache in den Urin. Im Vergleich zu proteingebundenem erscheint viel weniger LAL in den Fäces (33 ,21).

Versuche von Finot et al. (33) mit ^{14}C-markiertem Lysino-

alanin gaben genauere Auskunft über dessen Verbleib im Organismus. Nachdem bei Ratten, Mäusen, Hamstern und Wachteln per os appliziertes ^{14}C-LAL aus dem Darm aufgenommen war, waren geringe Mengen an Restaktivität wiederzufinden in Gehirn, Lunge und Leber sowie in Speichel- und Tränendrüsen, Knochen und Darmwänden. Bei allen in dieser Reihe untersuchten Tieren wurde LAL teilweise entweder durch die Darmflora oder im Organismus abgebaut, wobei $^{14}CO_2$ nachgewiesen wurde. Intravenöse Gaben von radioaktiv markiertem Lysinoalanin zeigten, daß es aus dem Blut auch in den Darm sezerniert wird. Während dieser Untersuchungen aber fand sich der größte Teil des Lysinoalanins in der Niere, und zwar am stärksten bei der Ratte, weniger ausgeprägt bei der Maus und am geringsten bei Hamster und Wachtel. Das LAL sammelte sich bei den Nagern vor allem in der Pars recta des proximalen Tubulus, bei der Wachtel erschien es gleichmäßig in der Niere verteilt.

Im Urin traten neben freiem LAL verschiedene Metabolite auf, so zum Beispiel acetylierte Formen, deren Bildung in der Niere erfolgt. Entsprechend seiner drei Aminogruppen kann das Lysinoalanin mono-, di- bzw. triacetyliert werden. Teilweise gelangten diese Metaboliten, nach Resorption aus der Niere, wieder in den Darm, um hier weiter von Mikroorganismen zu CO_2 umgesetzt zu werden.

Die beschriebene Metabolisierung des Lysinoalanins läuft nach Finot bei den untersuchten vier Tierarten ähnlich ab, die Rattenniere eliminiert jedoch das LAL und dessen Umsetzungsprodukte eindeutig am langsamsten.

Struthers et al. konnten zeigen, daß hohe Gehalte an proteingebundenem LAL im Futter gravider Ratten zu verminderten Geburtsgewichten führen. Die Zusammensetzung der Milch dieser Tiere war gegenüber den lysinoalanin-frei ernährten Kontrollen unverändert. LAL wurde in der Milch nicht gefunden.

Die Milchproduktion allerdings nahm mit steigendem LAL-Gehalt ab. Geringere Gewichtszunahmen der jungen Ratten nach der Geburt wurden hierauf zurückgeführt (83).

2.4.2. Toxikologie des Lysinoalanins

1967 und 1969 veröffentlichten Woodard et al. (91 , 92) Berichte über das Auftreten von Veränderungen in den Nieren von Ratten, nachdem diese einige Zeit mit Alpha-Protein (einem industriellen Soja-Protein-Isolat) ernährt worden waren. Zu Beginn der Nierenalterationen zeigten sich fettige Infiltrationen in den Rindenzellen. In der Pars recta des proximalen Tubulus kam es zu erhöhten Mitoseraten der Zellen mit anschließender Vermehrung des DNA-Gehaltes.

Bei allen Tieren waren sowohl die Kerne als auch die Zellen dieser Zone vier Wochen nach Beginn der Fütterung vergrößert (Karyo- bzw. Zytomegalie). Nach insgesamt sechs Wochen hatten die Kerne zytoplasmatische Invaginationen, die Lysozym, endoplasmatisches Retikulum und Fett enthielten. Durch weitere Untersuchungen wurde ausgeschlossen, daß die Zytomegalie von natürlicherweise in Sojabohnen vorkommenden Stoffen verursacht wurde. Im Jahre 1973 identifizierten Woodard und Short das nach Alkali-Behandlung von Soja-Protein entstehende Lysinoalanin (LAL = N^{ε}-(D-L-2-amino-2-carboxyäthyl)-L-Lysin als Ursache (93) der Veränderungen.

Im Gegensatz hierzu beobachteten De Groot und Slump bei Ratten nach Fütterung von isoliertem Soja-Protein, in dem sich unter Alkali-Einfluß Lysinoalanin gebildet hatte, nur Kalzifikationen in den Nieren (20). Erst nach Gabe einer Mindestmenge freien, ungebundenen Lysinoalanins ermittelten auch De Groot und Slump bei den Ratten Zytomegalie in der

Pars recta der proximalen Nierentubuli (21). Sie schlossen hieraus, daß proteingebundenes Lysinoalanin, das - wie schon beschrieben - zum großen Teil nicht resorbiert, sondern mit dem Kot ausgeschieden wird, keine Veränderung von Nierenzellen bewirken kann. Erst LAL-haltige Peptide von geringem Molekulargewicht (kleiner als 5000) sowie freies LAL konnten in genügender Menge aus dem Darm aufgenommen werden und Nierenzellvergrößerungen hervorrufen.

In bezug auf die Dosis, die hierfür nötig war, ergab sich, daß über 100 ppm an freiem LAL im Futter zunächst Karyomegalie, ab 1000 ppm Zytomegalie auftraten (21). Über 10 000 ppm wurden Nekrosen und Fibrosen gefunden, jedoch kam es immer gleichzeitig auch zu Regenerationen. Der Harnspiegel der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) war erhöht, das Harnsediment enthielt vermehrt amorphe Bestandteile.

Auch Woodard und Short stellten daraufhin bei Ratten Vergleiche über die Auswirkung der Fütterung von proteingebundenem gegenüber freiem Lysinoalanin (94) an. Nach Promine-D-[1] oder Alpha-Protein[2]-Gabe (LAL liegt in gebundener Form vor) zeigten sich Nierenveränderungen wie in den von ihnen vorher durchgeführten Versuchen. Die Diäten mit freiem LAL erbrachten jedoch schwerere Läsionen. Neben Karyo- und Zytomegalie traten bei steigendem LAL-Gehalt zunehmend Kernpyknose, Verluste an tubulären Epithelzellen und Dilatation der proximalen Tubuli auf.

Renale tubuläre Karyomegalie wird von vielen Stoffen, die als karzinogen bekannt sind, induziert (17, 95); jedoch muß diese nicht an sich das Zeichen für einen präkanzerogenen Zustand sein (42). Auch die einer LAL-Applikation folgende

---

1)2) isoliertes Soja-Protein industrieller Herstellung

Kernvergrößerung in Nierenzellen konnte bisher nicht mit einer Tumorgenese in Verbindung gebracht werden. Dieses Geschehen sollte eher allgemein als eine Aktivierung der betroffenen Zellen gewertet werden (72). So wurde letztlich in keinem der oben beschriebenen Versuche, selbst bei besonders hohen Gehalten an LAL in den Diäten, eine Funktionsminderung der Nierentätigkeit festgestellt.

Die zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Autoren könnten durch mehr oder weniger starke LAL-Empfindlichkeit verschiedener Rattenstämme bedingt sein. Während Woodard et al. die LAL-Wirkung an Sprague-Dawley-Ratten prüften, führte De Groot seine Untersuchungen an Wistar-Ratten durch. Möglicherweise sind auch die vier, zumindest theoretisch, auftretenden optischen Stereoisomere des Lysinoalanins verschieden in ihrer biologischen Aktivität (85). Die für die toxikologische Wirkung des LAL notwendige Freisetzung aus dem Proteinverband schließlich kann davon abhängig sein, ob die Verbindung durch intramolekulare Reaktion entstand, oder ob bei hoher Konzentration der Proteine sogar intermolekulare Verknüpfungen durch das LAL auftraten (82, 39).

Zu bedenken ist weiter, daß die beschriebenen Veränderungen nicht unbedingt allein vom Lysinoalanin herrühren müssen. Vor kurzem konnte für fruktoselysinhaltige, aber lysinoalaninfreie Proteine gezeigt werden, daß sie in Rattennieren Vergrößerungen der proximalen Tubuluszellen verursachen (98). Weitere bei Alkali-Behandlung von Proteinen auftretende Substanzen (Quervernetzungsprodukte, Dehydroalanin) bzw. dadurch entstehende Imbalanzen könnten auf ähnliche Weise wirken. Die Kalzifikationen in Rattennieren nach Fütterung von Rationen mit alkali-behandeltem Soja als Proteinquelle führten van Beek et al. (8) auf einen besonders hohen Gehalt der von ihnen verwendeten Diät an verfügbarem

Phosphor zurück. Sie deuteten an, daß vor der Interpretation von toxikologischen Auswirkungen bestimmter Rationen besonders deren ernährungsphysiologische Ausgewogenheit zu überprüfen sei. So berechneten sie, daß die allgemein schlechte Proteinqualität der Versuchsrationen bei Woodard und Short (93) hauptsächlich durch einen Mangel an Threonin und an Methionin hervorgerufen wurde (8), was möglicherweise auch die histologischen Ergebnisse beeinflußte.

Untersuchungen über die Auswirkungen von peptidgebundenem und freiem LAL wurden außer an Ratten auch an Mäusen, Hamstern, Kaninchen, Wachteln, Beagles und Rhesusaffen durchgeführt. Obwohl auch bei diesen Tierarten freies LAL aus dem Darmtrakt gut aufgenommen wird und anschließend in der Niere erscheint, waren hier die anatomisch-pathologischen und mikroskopischen Befunde negativ (21).

Diese tierartlich unterschiedliche Wirkung von Lysinoalanin könnte durch neuere Ergebnisse von D.C. Leegwater zu erklären sein. Bei der Bestimmung der im Rattenharn auftretenden LAL-Metaboliten fand Leegwater eine Substanz ganz ähnlich dem Produkt, das man nach Behandlung von Lysinoalanin mit L-Aminosäureoxidase erhält. Im Urin LAL-behandelter Hamster wurde dieser Metabolit nicht gefunden. Die Aktivität der L-Aminosäureoxidase in Leber und Niere ist bei den meisten Säugetieren gering. Eine Ausnahme macht die Rattenniere, in der eine relativ hohe Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden konnte (11). Die Nephrotoxizität des Lysinoalanins gerade bei der Ratte kann also möglicherweise durch diese Besonderheit des Stoffwechsels hervorgerufen werden (47).

2.4.3. Verminderung der Bildung von Lysinoalanin

Die Anwesenheit von Lysinoalanin in Nahrungs- und Futtermitteln ist zumindest aus ernährungsphysiologischen Gründen unerwünscht. Es sind daher Bemühungen angestellt worden, das Entstehen von LAL zu unterdrücken. Die Zugabe von Thioaminosäuren wie Cystein bei der Alkalibehandlung von Proteinen verringert das Auftreten von Lysinoalanin stark. Diese Verbindungen verhindern entweder die Dehydroalaninbildung oder reagieren mit bereits vorliegendem Dehydroalanin viel schneller als Lysin (29). Das Bewahren der ε-Aminogruppe des Lysins vor weiteren Reaktionen durch ihre Acetylierung oder Succinylierung läßt ihre Verbindung zu Lysinoalanin nicht mehr zu (38).

Es muß allerdings berücksichtigt werden, ob derartige Maßnahmen wirtschaftlich und aus ernährungsphysiologischen Gründen vertretbar sind. So sind einige der N-substituierten Lysinderivate nur noch gering oder überhaupt nicht mehr vom Organismus nutzbar (9,51,34,12). In vielen Fällen erscheint es daher sinnvoller, gegebenenfalls die Entstehung von Lysinoalanin durch Änderung der Nahrungstechnologie zu vermindern oder zu unterdrücken.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Untersuchungsmethoden

3.1.1. Rohnährstoffanalysen

Die Rohnährstoffanalysen wurden nach den Methoden des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten durchgeführt (Methodenbuch, Band III, 1976) (59).

3.1.2. Bestimmung der Trockensubstanz

Die Trockensubstanz wurde durch Trocknung des Untersuchungsmaterials bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz (ca. 16 h) ermittelt.

3.1.3. Vorbereitung der Proben für die Aminosäurenanalyse

Eine etwa 100 mg Rohprotein entsprechende Menge der für die Lysinoalanin-Analyse bestimmten Probe wurde am Rückflußkühler 24 Stunden lang mit 400 ml 6N Salzsäure bei Siedetemperatur hydrolysiert. Anschließend wurde das abgekühlte Hydrolysat mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. Hiervon wurden 100 ml - unter Zugabe von 10 µmol Norleucin als innerem Standard - am Rotationsverdampfer bei ca. 50°C eingeengt. Nach einmaligem Aufnehmen in 100 ml Aqua dest. und folgendem Verdampfen der Flüssigkeit wurde der Rückstand mit Citratpuffer pH 1.8 gelöst, am pH-Meter auf den Wert 1.8 eingestellt, mit dem pH 1.8-Puffer auf genau 100 ml aufgefüllt und durch ein Faltenfilter (Nr. 595 1/2, 185 mm Ø) filtriert.

3.1.4. Neuentwicklung einer Bestimmung von Lysinoalanin mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie

Die Trennung der Proben erfolgte nach dem sogenannten Einsäulenverfahren an dem automatischen Aminosäurenanalysator LC 6000 B der Firma Biotronic, München. Die verwendete Chromatographiesäule, 210 mm lang und 6 mm stark (Innendurchmesser), war mit dem Austauscherharz Durrum DC-4A gefüllt. Dieses Harz ist ein Polystyrolaustauscher mit einer Korngröße von 9 μ und einem 8 %igen Vernetzungsgrad. Je 100 - 200 μl einer wie oben beschrieben (s.S. 24) hergestellten Probe wurden aufgetragen. Bei einem Druck von ca. 40-50 bar wurden die Aminosäuren mit einem neuen, speziell für die LAL-Bestimmung entwickelten Vier-Puffer- und Drei-Temperaturenprogramm eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 34 ml/h. Tabelle 1 gibt das Analysenprogramm und die Zusammensetzung der Elutionspuffer an.

Im Anschluß an die Elution wurden die Aminosäuren mit Ninhydrinreagenz angefärbt, das über eine Pumpe mit einem Druck von ca. 10 bar bei einem Durchfluß von 17 ml/h zugegeben wurde. Die Herstellung des Reagenzes erfolgte durch Lösen von 200 g Ninhydrin in 7,5 l peroxydfreiem Methylglycol (Äthylenglycolmonomethyläther)[1] und 2,5l 4N Natriumacetatpuffer (1360 g krist. oder 820,4 g wasserfreies Na-acetat + 250 ml Eisessig, auf 2,5 l auffüllen, pH mit Essig-Säure auf 5,5l einstellen) . Als Reduktionsmittel wurde dem Ninhydrinreagenz kurz vor dem Gebrauch Titan-III-Chlorid in einer Menge von 8 ml/l zugegeben. Aufbewahrt unter N_2-Begasung in einer dunklen Glasflasche bei +4°C im Kühlschrank hatte das Ninhydrinreagenz eine maximale Haltbarkeit von einem Monat.

Nach Mischung von Eluat und Reagenz entwickelte sich in einer Teflonspirale (50 m lang, Innendurchmesser 0,2 mm),

---

1) Wir danken der Firma Hoechst AG für die Spende.

die in einem Bad mit kochendem Wasser lag, ein colorimetrisch bestimmbarer Farbkomplex. Die kontinuierliche Messung der Farbintensität erfolgte automatisch in einem 2-Kanal-Photometer, und zwar für die meisten Aminosäuren (blau-violetter Farbkomplex) bei 570 nm und für Prolin und Hydroxyprolin bei 440 nm. War der Lysinoalanin-Gehalt einer Probe niedrig, so mußte vom Hydrolysat eine entsprechend große Menge eingespritzt werden. Um für die exakte Bestimmung der übrigen Aminosäuren im linearen Bereich des Photometers zu bleiben, mußte dann noch eine zweite Analyse mit verdünntem Hydrolysat durchgeführt werden. Entsprechend der zu erwartenden LAL-Konzentration war auch die Empfindlichkeit des Photometers unterschiedlich eingestellt. Die Anfärbekonstanten der ninhydrinpositiven Substanzen im fraglichen Bereich betrugen (Norleucin als interner Standard = 1) für Hydroxylysin 1.04 (Doppelpeak als Summe von zwei Einzelpeaks berechnet), für Lysinoalanin 1.45, für Ornithin 0.99 und für Lysin 1.08. Die Meßimpulse des Kolorimeters wurden von einem angeschlossenen Schreibgerät automatisch registriert und in ein Chromatogramm umgesetzt. Dabei wurde jede Aminosäure als einzelner "Peak" in Form einer Gaußschen Kurve aufgezeichnet.

Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten wurden von einem Rechner (Autolab, System I der Firma Spectra Physics), bezogen auf einen vor jeder Analyse gegebenen Standard, ausgedruckt. Nach Beendigung eines jeden Laufes wurde die Säule automatisch mit NaOH (0.35N) und Puffer A (s. Tab. 1, S. 27) regeneriert.

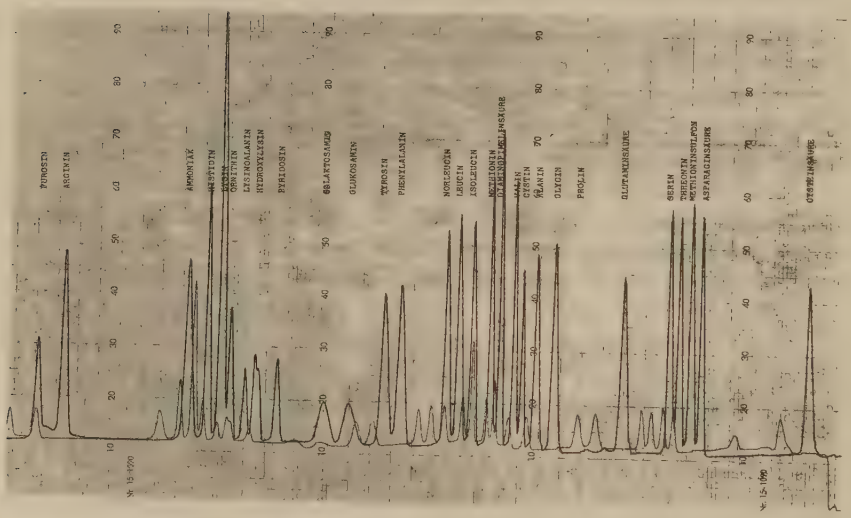
Abbildung 4 zeigt das Chromatogramm eines Aminosäurenstandardgemisches mit Zusatz von Furosin, Pyridosin, Lysinoalanin sowie Ornithin, Hydroxylysin, Galaktosamin und Glukosamin.

Tabelle 1: Analysenprogramm und Zusammensetzung der Elutionspuffer

Pufferbezeichnung	A	B	C	D	NaOH	A
pH-Wert der Puffer	3.16	4.20	6.10	6.28	--	3.16
Na^+-Normalität	0.16	0.20	0.95	1.50	0.35	0.16
Na.citrat.$2H_2O$ (g/l)	15.7	15.7	15.7	15.7	--	15.7
Na.chlorid (g/l)	--	2.3	46.2	78.4	--	--
HCl, 37 % (ml/l)	10	8.4	--	--	--	10
Thiodiäthanol (ml/l)	2	--	--	--	--	2
Caprylsäure (ml/l)	0.1	--	--	--	--	0.1
Phenol (ml/l)	1	1	1	1	--	1
Brij 35 (20 %ig/ml/l)	4.5	4.5	4.5	4.5	--	4.5
Laufzeit d. Puffer (min.)[a]	9	34	23	40	15	39
Säulentemperatur (^oC)	48^o	48^o	55^o	55^o	66^o	$66/48^o$
Analysenzeit (min.)	9	43	66	106	121	160

[a] Die Laufzeit der Puffer entspricht wegen der zeitlichen Verzögerung der Puffer in den Leitungen nicht der Elutionszeit.

Abbildung 4: Chromatogramm eines Aminosäurenstandard-gemisches mit Zusatz von Furosin, Pyridosin, Lysinoalanin sowie Ornithin, Hydroxylysin, Galaktosamin und Glukosamin.
Analysenablauf von rechts nach links



3.2. Untersuchungsmaterial

Die im folgenden beschriebenen Versuche über die Bildung von Lysinoalanin wurden mit drei verschiedenen Eiweißträgern, isoliertem Sojaprotein, Säurekasein und Natriumkaseinat durchgeführt. Tabelle 2 gibt für diese Produkte neben den pH-Werten (bei ca. 90 % Wasser) die Daten einer Nährstoffanalyse[1] an.

Tabelle 2: Nährstoffanalyse von drei verschiedenen Eiweißträgern

Bezeichnung:	Sojaprotein	Kasein	Na-Kaseinat
Rohprotein	85,6	88,4	87,5
Rohfett	2,53	0,65	0,62
Asche	2,4	1,1	3,4
Wasser	6,4	5,9	5,9
Calcium	0,24	0,08	0,03
Phosphor	0,62	0,27	0,70
pH	4,6	4,6	7,0

Alle in der Arbeit angegebenen Aminosäurenkonzentrationen wurden auf Trockensubstanz (TS) bezogen und in g/100 g TS angegeben. Auf die sonst übliche Umrechnung auf den Rohproteingehalt (RP) wurde verzichtet, da in Proben mit hohen pH-Werten nicht kalkulierbare Veränderungen dieser Größe (z.B. durch NH_3-Verluste) auftreten können. Die Behandlung der Modellproteine wird im einzelnen vor den Ergebnissen der jeweiligen Versuchsreihen beschrieben.

---

1) Methoden des Verbandes Deutscher Forschungs- und Untersuchungsanstalten (59).

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Untersuchungen über die Freisetzung des Lysinoalanins bei der Säurehydrolyse von Proteinen

Für die Untersuchungen über die optimalen Bedingungen zur LAL-Hydrolyse wurde eine Probe aus der Versuchsreihe 3.3.2.1.2. (s.S.35) verwendet. Das entsprechende Säurekasein war mit ca. 90 % Wasser bei einem pH-Wert von 10 24 Stunden lang bei 110°C erhitzt und 24 Stunden lang bei 50°C nachgetrocknet worden. Der Lysinoalaninwert dieser Probe, der im Anschluß an die unter 3.1.3. S. 24 beschriebenen Methode zur Vorbereitung für die Analyse ermittelt wurde, betrug 1.02 g/100 g TS.

3.3.1.1. Einfluß der Hydrolysendauer auf die Freisetzung von Lysinoalanin

Jeweils 250 mg der oben angeführten Probe (s.S.35) wurden 8. 12, 16, 20, 24, 28, 32 und 48 Stunden lang mit 400 ml 6N Salzsäure am Rückfluß hydrolysiert.

Die Berechnung der ermittelten LAL-Werte nach einer Regression II. Grades ergab, daß Lysinoalanin durch Kochen von 8 bis 32 Stunden mit 6N Salzsäure zunehmend aus dem Proteinverband gelöst wurde. Die Menge an LAL, die nach 48stündiger Hydrolyse ermittelt wurde, entsprach derjenigen nach 32 Stunden. Tabelle 3 zeigt die in diesen Untersuchungen nachgewiesenen LAL-Konzentrationen zusammen mit den nach der quadratischen Regression berechneten Ergebnissen.

Tabelle 3: Freisetzung von Lysinoalanin aus Säurekaseinproben (je 250 mg pH 10, Erhitzung 24 Stunden bei 110°C) nach Hydrolyse mit je 400 ml 6N HCl über 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 bzw. 48 Stunden

Hydrolysenzeit Stunden		Lysinoalanin (g/100gTS)			Lysinoalanin (Regress.II. Grd.)
8		0.88	0.87	0.91	0.89
	$\bar{x}$	**0,89**			
12		0.96	0.96		0.94
	$\bar{x}$	**0,96**			
16		1.01	1.01	0.91	
		0.94	0.95		0.98
	$\bar{x}$	**0,96**			
20		1.02	1.02	0.97	1.02
	$\bar{x}$	**1,00**			
24		1.08	0.99	1.02	
		1.05	1.02		1.05
	$\bar{x}$	**1,03**			
28		1.01	1.04	1.02	1.07
	$\bar{x}$	**1,02**			
32		1.02	1.02		1.09
	$\bar{x}$	**1,02**			
48		1.04	0.93		1.09
	$\bar{x}$	**0,98**			

3.3.1.2. Einfluß der Normalität der zur Hydrolyse verwendeten Salzsäure auf die Freisetzung von Lysinoalanin

Je 250 mg der Kaseinprobe wurden 24 Stunden lang mit 400 ml 5, 6, 7 oder 8 normaler Salzsäure hydrolysiert.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, ist das LAL im Bereich einer Normalität von 6N-8N Salzsäure gegenüber einer Erhöhung der Normalität der Salzsäure unempfindlich. Die 5N-Salzsäure dürfte hinsichtlich ihrer Konzentration noch nicht ganz für eine optimale hydrolytische Freisetzung des LAL ausreichen.

3.3.2. Einflüsse und Bedeutung verschiedener Faktoren auf die Bildung von Lysinoalanin

3.3.2.1. Auswirkungen des pH-Wertes und der Erhitzungstemperatur auf die Bildung von Lysinoalanin und die Konzentrationen anderer Aminosäuren

3.3.2.1.1. Untersuchungen an isoliertem Sojaprotein; Erhitzung 24 Stunden bei 110°C

Je 100 g isoliertes Sojaprotein wurden mit 900 ml Aqua dest. angerührt. Die Lösungen wurden bei 22°C mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf den pH-Wert 4, 5, 6, 7, 8, 9 bzw. 10 eingestellt; eine Probe behielt den Ausgangs-pH-Wert der Suspension von 4.6. Jede dieser Proben wurde in einer Emailschale in einer Schichtdicke von 22 mm bei 110°C im Trockenschrank 24 Stunden lang erhitzt und noch einmal 24 Stunden bei 50°C nachgetrocknet. Nach dem Mahlen der trockenen Produkte erfolgte die Hydrolyse wie unter 3.1.3. (s.S. 24) angegeben.

Tabelle 4: Freisetzung von Lysinoalanin aus einer Säurekaseinprobe (pH 10, Erhitzung 24 Stunden bei 110°C) nach 24stündiger Hydrolyse von je 250 mg mit 400 ml 5, 6, 7 bzw. 8normaler Salzsäure.

Normalität der Salzsäure	Lysinoalanin (g/100g TS)		
5	0.95	0.91	0.93
$\bar{x}$	**0,93**		
6	0.98	0.92	0.96
$\bar{x}$	**0,95**		
7	0.95	0.94	0.96
$\bar{x}$	**0,95**		
8	0.95	0.97	0.98
$\bar{x}$	**0,97**		

Tabelle 5: Isoliertes Sojaprotein, ca. 90 % Wassergehalt, 24 Stunden bei 110°C erhitzt.
Das Verhalten der Aminosäuren Threonin, Serin, Lysin, Arginin und Lysinoalanin in Abhängigkeit vom pH-Wert.

pH-Wert		Threonin %	Serin %	Lysinoalanin %	Lysin %	Arginin %
4		3.0	4.5	0.02	5.4	6.5
5		3.0	4.7	0.01	5.6	6.7
6		3.0	4.7	0.02	5.6	6.7
7		3.4 3.5 3.0	4.6 4.6 3.6	0.03 0.03 0.02	5.5 5.5 4.6	6.5 6.8 5.5
	$\bar{x}$	**3.3**	**4.3**	**0.03**	**5.2**	**6.3**
8		3.4 3.5 3.5	4.7 4.6 4.7	0.04 0.04 0.04	5.5 5.5 5.3	6.5 6.8 6.4
	$\bar{x}$	**3.5**	**4.7**	**0.04**	**5.4**	**6.6**
9		2.7 3.4 3.6	3.7 4.5 4.9	0.08 0.06 0.05	4.6 5.4 5.7	5.6 6.7 6.7
	$\bar{x}$	**3.2**	**4.4**	**0.06**	**5.2**	**6.3**
10		3.5 3.3 3.7	4.6 4.2 5.1	0.09 0.10 0.08	5.4 5.3 5.5	6.6 6.6 6.7
	$\bar{x}$	**3.5**	**4.6**	**0.09**	**5.4**	**6.6**

Untersucht wurden die Aminosäuren Threonin (Thr), Serin (Ser), Lysin (Lys), Arginin (Arg) und Lysinoalanin (LAL). Während für die Konzentrationen der vier erstgenannten Substanzen mit steigendem pH-Wert keine Veränderungen festzustellen waren, zeigte sich eindeutig, daß der LAL-Gehalt in den Proben von pH 4 bis pH 10 zunahm (Regression II. Grades mit einer Signifikanz von $p \leq 0.01$). Die Werte für diese Versuchsreihe sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

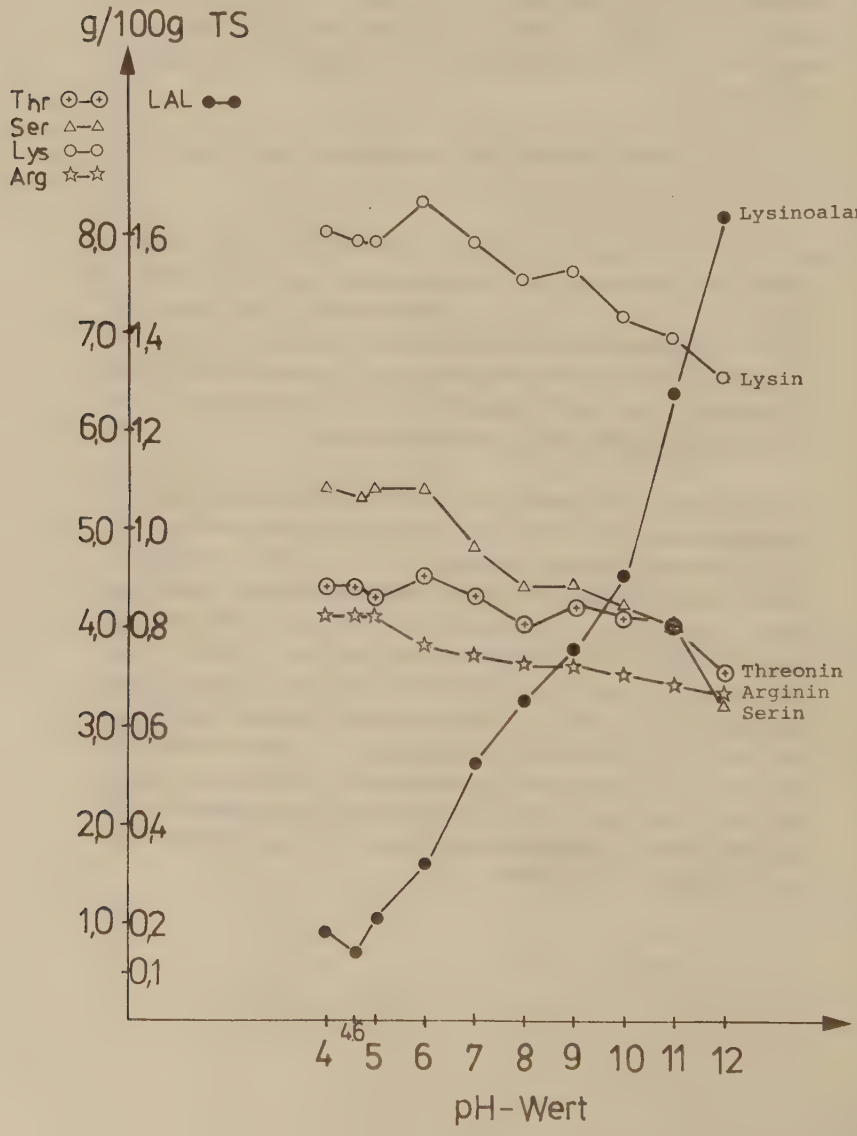
3.3.2.1.2. Untersuchungen an Säurekasein; Erhitzung 24 Stunden bei 110°C

Je 100 g Säurekasein wurden mit 900 ml Aqua dest. versetzt, die pH-Werte mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 eingestellt; eine Probe behielt den ursprünglichen pH-Wert der Suspension von 4, 6. In Emailschalen wurden die Lösungen (Schichtdicke 22 mm) 24 Stunden lang im Trockenschrank bei 110°C erhitzt und 24 Stunden lang bei 50°C nachgetrocknet.

Die 24stündige Erhitzung des Kaseins erbrachte mit ansteigendem pH-Wert eine signifikante Zunahme der Lysinoalaninkonzentration (Regression II. Grades, $p \leq 0.01$). Gleichzeitig sanken die entsprechenden Gehalte an Serin, Lysin und Arginin ab (Regression I. Grades, $p \leq 0.01$). Der Threonin-Gehalt stieg zunächst von pH 4 bis pH 5 und fiel anschließend bis pH 12 hin stetig ab (quadratische Regression $p \leq 0.05$). Die statistische Überprüfung, ob das Ansteigen der LAL-Konzentration mit dem Absinken der übrigen Aminosäuren zusammenhängt, zeigt, daß sowohl Thr, Ser, Lys als auch Arg negativ zum Lysinoalanin korreliert waren. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5:

Säurekasein, ca. 90 % H_2O, Erhitzung 24 Stunden bei 110°C
pH-Wert-abhängige Änderung der Konzentration von Threonin,
Serin, Lysin, Arginin (linksseitige Einteilung der Ordinate)
und Lysinoalanin (rechtsseitige Ordinateneinteilung)



3.3.2.1.3. Vergleich der pH-Wert-abhängigen Lysinoalaninbildung in isoliertem Sojaprotein und Säurekasein;
Erhitzung 24 Stunden bei 110°C

Bei Gegenüberstellung der beiden Eiweißträger Sojaprotein und Säurekasein im Hinblick auf die Lysinoalaninbildung nach Erhitzen von Teilproben bei unterschiedlichen pH-Werten zeigte sich, daß selbst bei hohen pH-Werten die LAL-Konzentrationen im Soja (s. Tab. 5) weit hinter denen von Kasein (s. Abb. 5) zurückbleiben. Diese Abweichungen stellt Abbildung 6 für den Bereich von pH 7 bis 10 dar.

3.3.2.1.4. Erhitzung von Säurekasein bei 90°C (24 h)

Diese Versuchsreihe wurde mit Säurekasein (je 100 g + 900 ml Aqua dest.) im pH-Bereich 4 - 12 in ähnlicher Weise wie unter 3.3.2.1.2. (S. 35) beschrieben, durchgeführt. Im vorliegenden Versuch mußten allerdings nach dem 24stündigen Erhitzen bei 90°C die Proben bei 50°C im Vakuumtrokkenschrank (18 mmHg) getrocknet werden.

Im pH-Bereich pH 4 - pH6 ergab sich nach der Erhitzung eine nur unwesentliche Änderung der Lysinoalaningehalte. Darüber, insbesondere von pH 7 bis pH 12, nahm das LAL zu (Regression II. Grades, $p \leq 0.01$). Dabei ist der Anstieg zwischen den pH-Werten 10 bis 12 steiler als zwischen den Werten pH 7 bis 10. Gleichzeitig zur Erhöhung des Lysinoalaningehalts kam es zum Absinken der Konzentrationen an Threonin, Serin, Lysin und Arginin. Diese negative Korrelation war in allen Fällen signifikant. Die beschriebenen Zusammenhänge sind Abbildung 7 zu entnehmen.

Abbildung 6:

Gegenüberstellung der pH-Wert abhängigen Bildung von Lysinoalanin in isoliertem Sojaprotein und in Säurekasein.
Beide Eiweißträger ca. 90 % Wasser, Erhitzung 24 Stunden bei 110°C

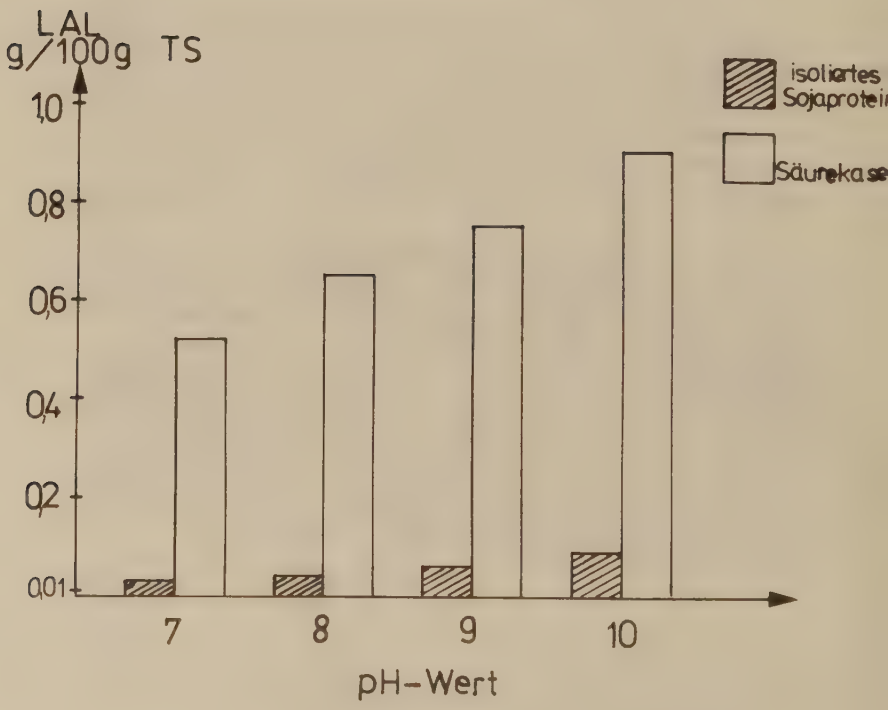
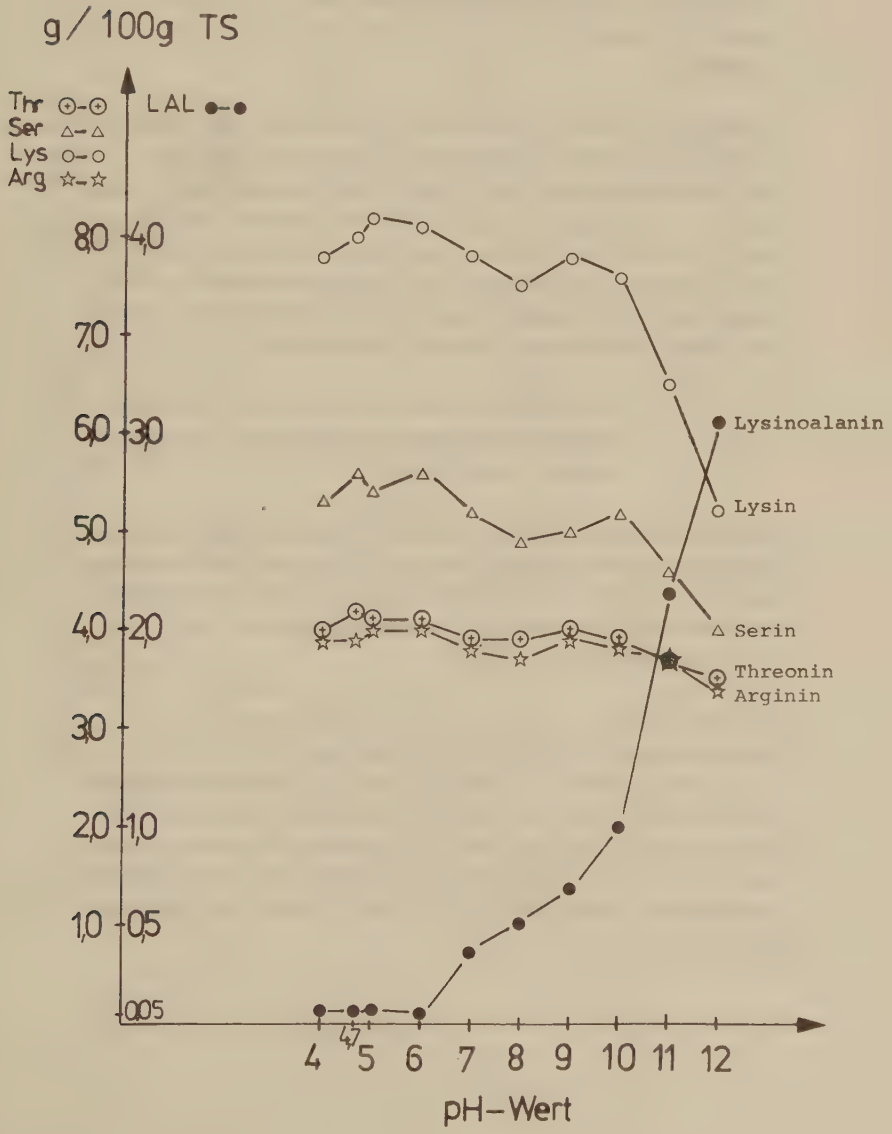


Abbildung 7:

Säurekasein ca. 90 % H_2O, Erhitzung 24 Stunden lang bei 90°C
pH-Wert abhängige Änderung der Konzentration von Threonin,
Serin, Lysin, Arginin (linksseitige Einteilung der Ordinate)
und Lysinoalanin (rechtsseitige Ordinateneinteilung)



3.3.2.1.5. Erhitzung von Säurekasein bei 70°C (24 h)

Um die Entstehung von LAL in Säurekasein bei 70°C (24 Stunden) zu prüfen, wurden in Kaseinproben (ca. 90 % Wasser) mit Natronlauge die pH-Werte 6, 7, 8 bzw. 11 eingestellt. Nach dem eigentlichen Erhitzen wurden die Proben 24 Stunden im Vakuum (18 mmHg) bei 50°C nachgetrocknet.

Im Kasein mit den pH-Werten 6, 7 und 8 war nach Hitzeeinwirkung kein Lysinoalanin nachzuweisen. Die Menge der Aminosäuren Thr, Ser, Lys und Arg änderte sich kaum. Die Erhitzung von allerdings nur zwei Proben bei dem pH-Wert 11 erbrachte dagegen einen besonders hohen Gehalt an Lysinoalanin. Die Werte der übrigen Aminosäuren (s.o.) lagen hier weit unter denen, die bei saurem bzw. schwach basischem pH ermittelt wurden (s. Tabelle 6).

3.3.2.1.6. Zusammenfassender Vergleich der Lysinoalanin-Bildung im Säurekasein bei den unterschiedlichen Temperaturen

Die Lysinoalanin-Ergebnisse der auf den Seiten 35 bis 40 beschriebenen Versuche mit Säurekasein bei verschiedenen pH-Werten werden in Abbildung 8 noch einmal im Hinblick auf die Einflüsse der Erhitzungstemperaturen (70°, 90°, 110°C) gegenübergestellt.

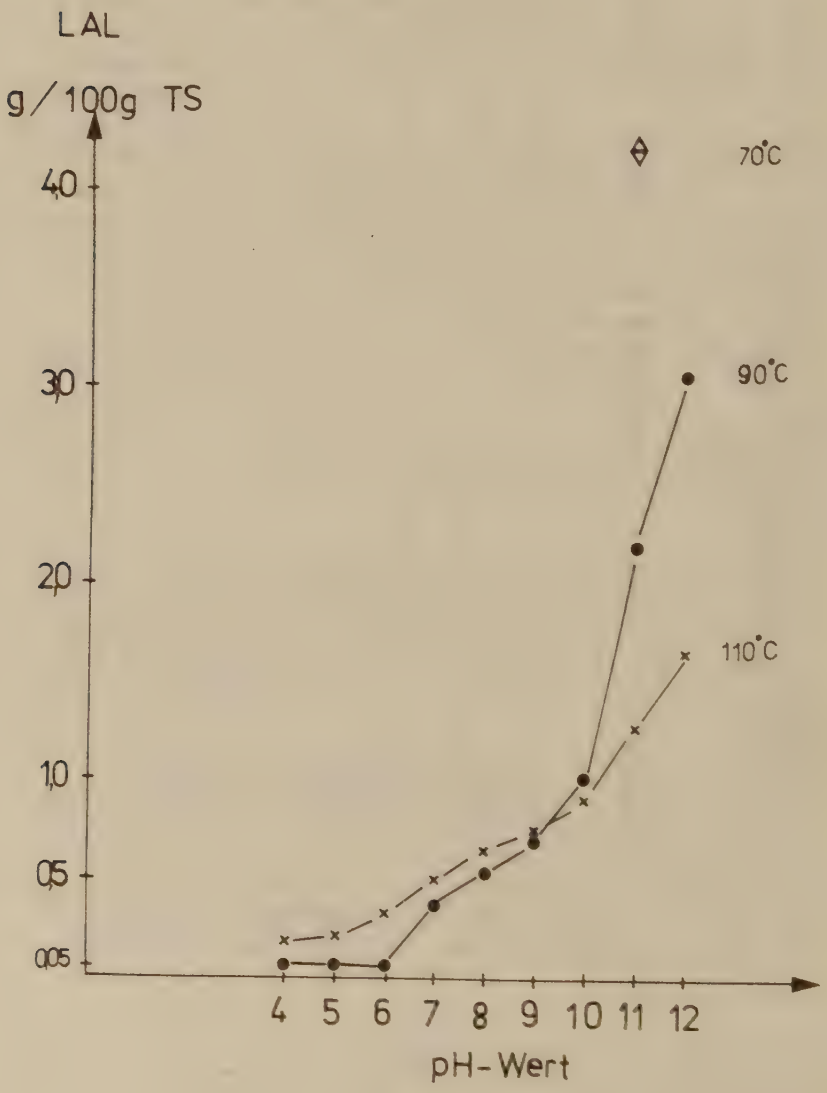
Während im sauren und leicht basischen pH-Bereich die LAL-Entstehung von 70°C (kein LAL) über 90° auf 110°C geringfügig ansteigt, nimmt im stark alkalischen Milieu offensichtlich der LAL-Gehalt mit steigender Temperatur ab. Nach der Erhitzung bei 70°C wurde die absolut höchste Lysinoalanin-Konzentration nachgewiesen. Bei den 90°C Proben wurde stets (pH 10, 11 und 12) mehr LAL gefunden als bei 110°C.

Tabelle 6: Säurekasein, ca. 90 % Wassergehalt, 24 Stunden bei 70°C erhitzt. Konzentrationen von Threonin, Serin, Lysinoalanin, Lysin und Arginin in Proben mit den pH-Werten 6, 7, 8 bzw. 11

pH		Threonin %	Serin %	Lysinoalanin %	Lysin %	Arginin %
6		3.9 4.3 4.1 4.2	5.2 5.5 5.9 5.6	- - - -	7.3 7.9 8.4 8.4	3.4 3.9 3.6 3.9
	$\bar{x}$	**4.1**	**5.6**		**8.0**	**3.7**
7		3.9 3.5 4.0 3.3	5.2 4.6 5.6 5.0	- - - -	7.3 6.9 8.1 7.4	3.4 3.3 3.6 3.2
	$\bar{x}$	**3.7**	**5.1**		**7.4**	**3.4**
8		4.0 4.0 3.6 4.1	5.3 5.2 5.3 5.4	- - - -	7.5 7.4 7.6 8.3	3.6 3.7 3.3 3.7
	$\bar{x}$	**3.9**	**5.3**		**7.7**	**3.6**
11		1.6 3.0	2.2 3.6	4.7 3.5	4.4 4.9	3.0 2.2
	$\bar{x}$	**2.3**	**2.9**	**4.1**	**4.6**	**2.6**

Abbildung 8:

Vergleich der pH-Wert-abhängigen Bildung von Lysinoalanin in Säurekaseinlösungen (jeweils ca. 90 % Wasser) nach 24 stündigem Erhitzen bei 70°, 90° bzw. 110°C



3.3.2.2. Untersuchung der Lysinoalaninbildung in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer

Säurekasein mit einem Wassergehalt von ca. 90 % wurde mit Natronlauge auf den pH-Wert 10 eingestellt. Je 100 ml dieser Mischung wurden in geschlossenen Glasflaschen 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 oder 24 Stunden lang 90°C ausgesetzt. Nach Ablauf der entsprechenden Erhitzungszeit wurden jeweils ca. drei Gramm einer Probe 24 Stunden mit 400 ml 6N Salzsäure hydrolysiert.

Die Berechnung der LAL-Konzentrationen dieser Versuchsreihe als Regression II. Grades ($p \leq 0.01$) zeigt, daß von drei bis 12 Stunden Erhitzungsdauer die LAL-Gehalte ansteigen, anschließend wieder abfallen. Der 24-Stunden-Wert lag sogar unter dem nach drei Stunden gemessenen Gehalt. Das Threonin verläuft entsprechend (Anstieg bis zu 12 Stunden, anschließender Abfall). Für Serin wurde ein Absinken mit zunehmender Dauer der Temperatureinwirkung ermittelt. Eine Veränderung von Lysin und Arginin konnte nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchungsergebnisse zeigt Tabelle 7 . In Abbildung 9 werden die gemessenen Lysinoalaninmengen in einer quadratischen Regression dargestellt.

3.3.2.3. Einfluß des Wassergehaltes auf die Entstehung von Lysinoalanin

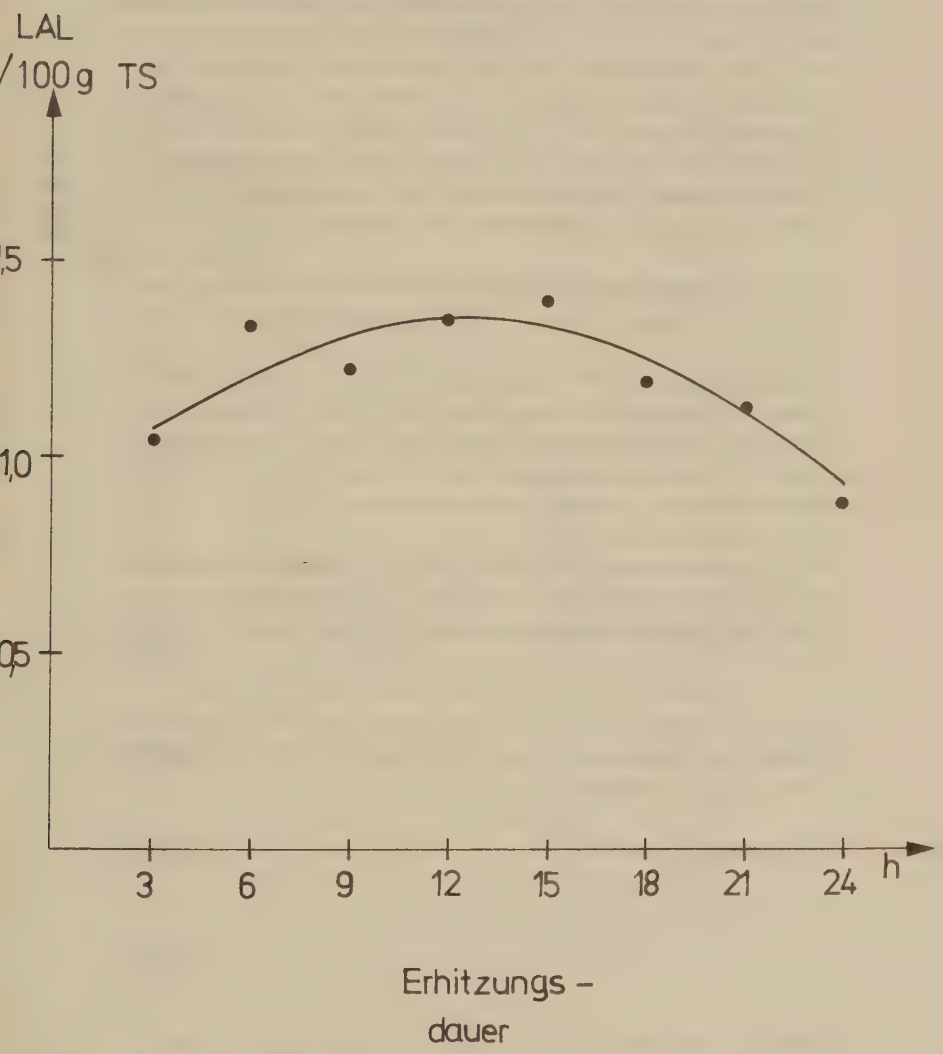
Patentverschluß-Dosen mit 200 ml Inhalt wurden bis zum Rand mit Natriumkaseinat (pH 7), das einen Wassergehalt von 20, 40, 60 oder 80 % hatte, gefüllt. Die geschlossenen Dosen wurden 24 Stunden bei 90°C erhitzt. Anschließend wurde jede Probe in einem offenen Gefäß 24 Stunden lang im Vakuumschrank (18 mm Hg, 50°C) getrocknet. Darauf

Tabelle 7: Säurekasein, ca. 90 % Wassergehalt, pH-Wert 10,
Erhitzung in geschlossenen Glasflaschen 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 bzw. 24 Stunden bei 90 °C
Konzentrationen der Aminosäuren Threonin, Serin, Lysinoalanin, Lysin und Arginin in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer

Erhitzungsdauer (90°C) Stunden	Threonin %		Serin %		Lysinoalanin %		Lysin %		Arginin %	
3	3.3	3.3	4.6	4.5	1.09	1.00	7.4	7.2	3.6	3.5
6	3.4	3.4	4.4	4.4	1.31	1.39	7.1	7.0	3.5	3.5
9	3.5	3.8	4.8	4.5	1.42	1.03	6.9	6.9	3.5	3.4
12	4.1	4.0	4.3	4.4	1.29	1.38	7.2	7.4	3.6	3.5
15	3.9	3.8	4.4	4.2	1.41	1.42	7.3	7.2	3.5	3.6
18	3.6	3.6	4.1	3.9	1.25	1.12	7.0	6.9	3.5	3.5
21	3.5	3.6	3.8	3.9	1.08	1.18	6.8	7.0	3.3	3.4
24	3.4	3.5	4.1	4.0	1.10	0.91	7.2	6.9	3.5	3.5

Abbildung 9:

Lysinoalaninbildung in Säurekaseinproben (ca. 90 % Wassergehalt, pH 10) nach 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24stündiger Erhitzung in geschlossenen Glasflaschen bei 90°C
Berechnung der Werte nach einer Regression II. Grades



folgte die übliche Hydrolyse.

Die Daten aus diesem Versuch wurden nach dem H-Test nach Kruskal und Wallis (46) überprüft. Mit steigendem Wasseranteil des Na-Kaseinates nahm nach Hitzeeinwirkung von 90°C die LAL-Bildung ab. Ein statistisch gesicherter Unterschied besteht zwischen den Proben mit 20 % H_2O einerseits und 60 bzw. 80 % H_2O andererseits. Für die Aminosäuren Thr, Ser, Lys und Arg ergaben sich keine signifikanten Änderungen in Abhängigkeit vom Wassergehalt. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der Versuche.

3.3.2.4. Gegenüberstellung der Lysinoalanin-Bildung bei offener und bei geschlossener Erhitzung

Säurekasein, ca. 90 % H_2O, pH 10, wurde einmal in Emailschalen (in einer Schichtdecke von 22 mm), zum anderen in Patentverschluß-Dosen (Inhalt 200 ml) 24 Stunden lang bei 90°C im Trockenschrank erhitzt und weitere 24 Stunden im Vakuum (18 mmHg) nachgetrocknet (50°C).

Die Aminosäurenanalyse ergab, daß die offen getrockneten Proben fast den doppelten Gehalt an Lysinoalanin gegenüber dem in geschlossenen Dosen erhitzten Kasein enthielten.

Diese Einzelwerte sind mit den entsprechenden Konzentrationen von Threonin, Serin, Lysin und Arginin der Abbildung 11 zu entnehmen.

Abbildung 10:

Natriumkaseinat, Wassergehalt 20, 40, 60, 80 %
Erhitzung in Patentverschlußdosen 24 Stunden lang bei 90°C
Konzentrationen der Aminosäuren Threonin, Serin, Lysin und Arginin (linksseitige Ordinateneinteilung) sowie Lysinoalanin (rechtsseitige Ordinateneinteilung) in Abhängigkeit vom Wassergehalt

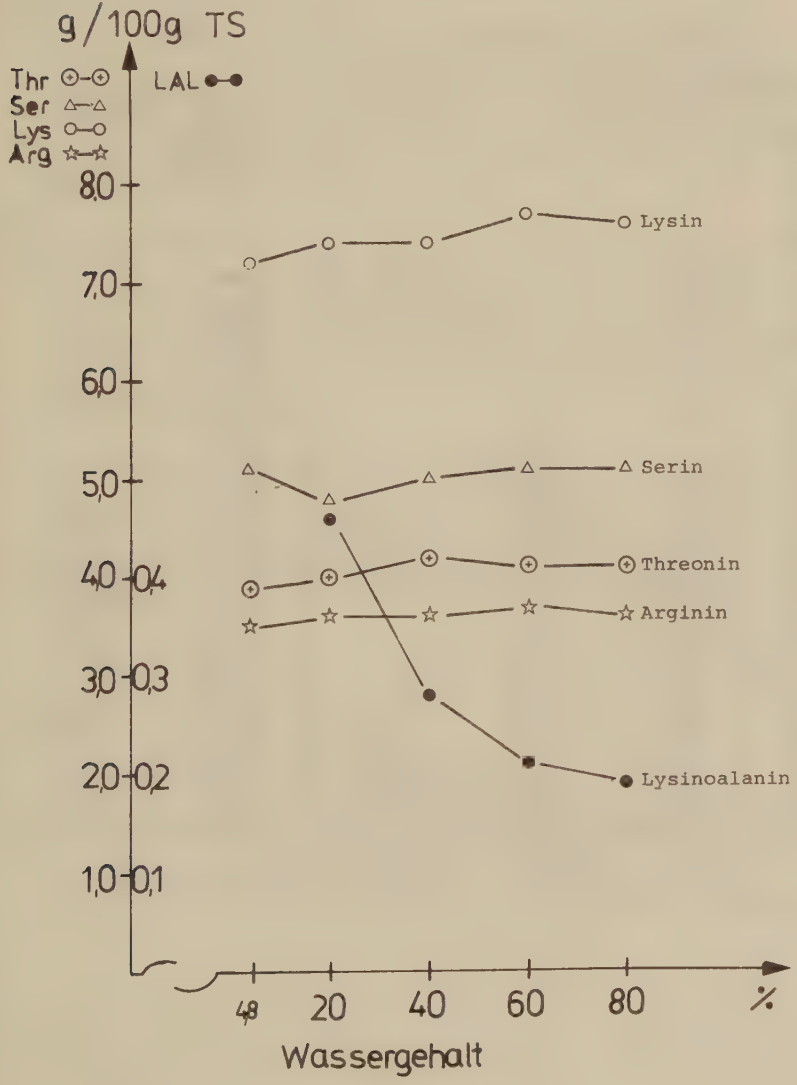
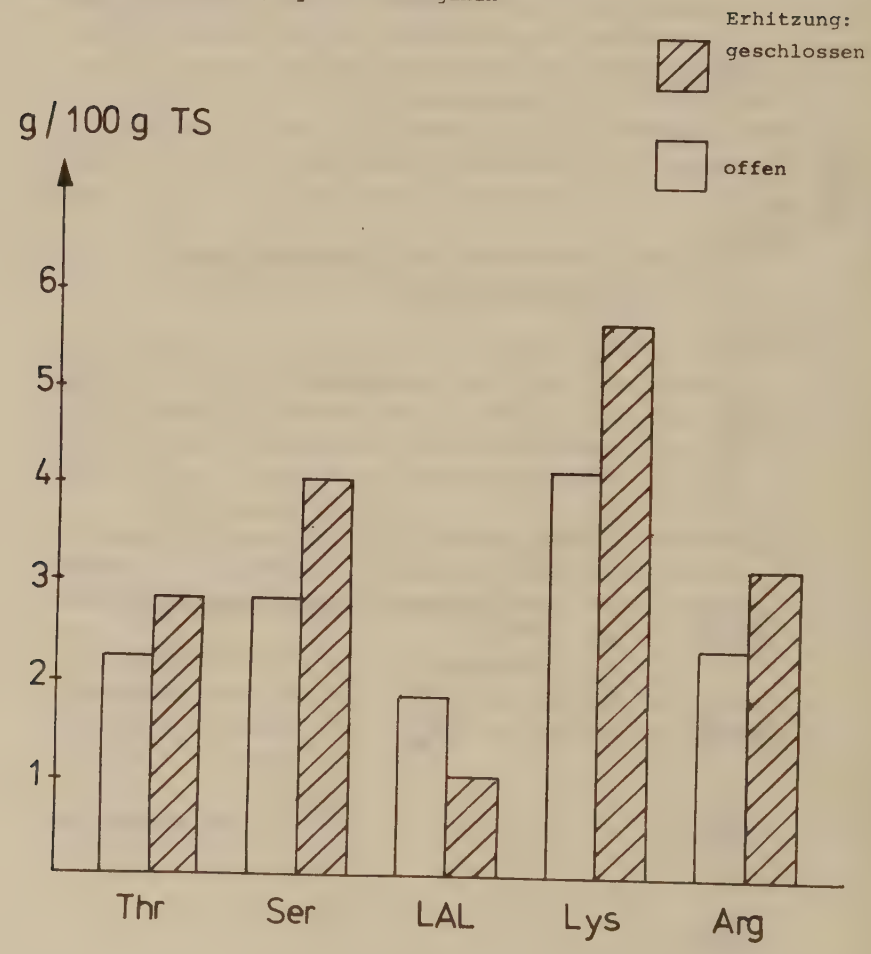


Abbildung 11:

Säurekasein, ca. 90 % Wasser, pH 10,
Erhitzung in Patentverschlußdosen (geschlossen)
bzw. in Emailschalen (offen) für 24 h bei 90°C
Konzentrationen der Aminosäuren Threonin,
Serin, Lysinoalanin, Lysin und Arginin



3.3.2.5. Auswirkung der zur pH-Wert-Einstellung verwendeten Substanzen NaOH, Na_2CO_3 bzw. $NaHCO_3$ auf die Lysinoalaninbildung

3.3.2.5.1. Proben mit gleichem pH-Wert

Zu Kaseinlösungen mit ca. 90 % H_2O wurde jeweils soviel NaOH, Na_2CO_3 oder $NaHCO_3$ zugegeben, bis ein pH-Wert von sieben erreicht war. In offenen Emailschalen kamen die Proben 24 Stunden lang bei 90°C in den Trockenschrank und wurden anschließend bei 50°C (24 Stunden, Vakuum von 18 mmHg) nachgetrocknet.

Nach der Erhitzung waren die LAL-Gehalte am höchsten in Proben, bei denen $NaHCO_3$ zum pH-Wert-Einstellen verwendet wurde. Die geringsten Werte ergaben sich nach Zugabe von NaOH. Die LAL-Konzentrationen sind mit den entsprechenden Angaben über Threonin, Serin, Lysin und Arginin der Tabelle 8 zu entnehmen.

Berücksichtigt man für die drei Laugen die Natriummenge, die jeweils benötigt wurde, um in den Kaseinlösungen den pH-Wert sieben zu erreichen, wird ersichtlich, daß die Entstehung des Lysinoalanins mit steigendem Verbrauch an Na-Ionen (NaOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$) zunimmt (siehe Abbildung 12).

3.3.2.5.2. Proben, denen jeweils die gleichen Mengen Natrium zugegeben wurden

Säurekasein, ca. 90 % Wasser, wurde so mit NaOH, Na_2CO_3 bzw. $NaHCO_3$ versetzt, daß jedesmal die gleiche Menge Natrium (1.05 g) verbraucht wurde. Es ergaben sich hierdurch, der Reihenfolge der Laugen entsprechend, pH-Werte von 7.0, 6.4, 6.3. Auch diese Proben wurden offen in Schalen

Tabelle 8: Säurekasein, ca. 90 % Wassergehalt; Proben mit NaOH, Na_2CO_3 oder $NaHCO_3$ jeweils auf den pH-Wert 7 eingestellt.
Offene Erhitzung 24 Stunden lang bei 90°C

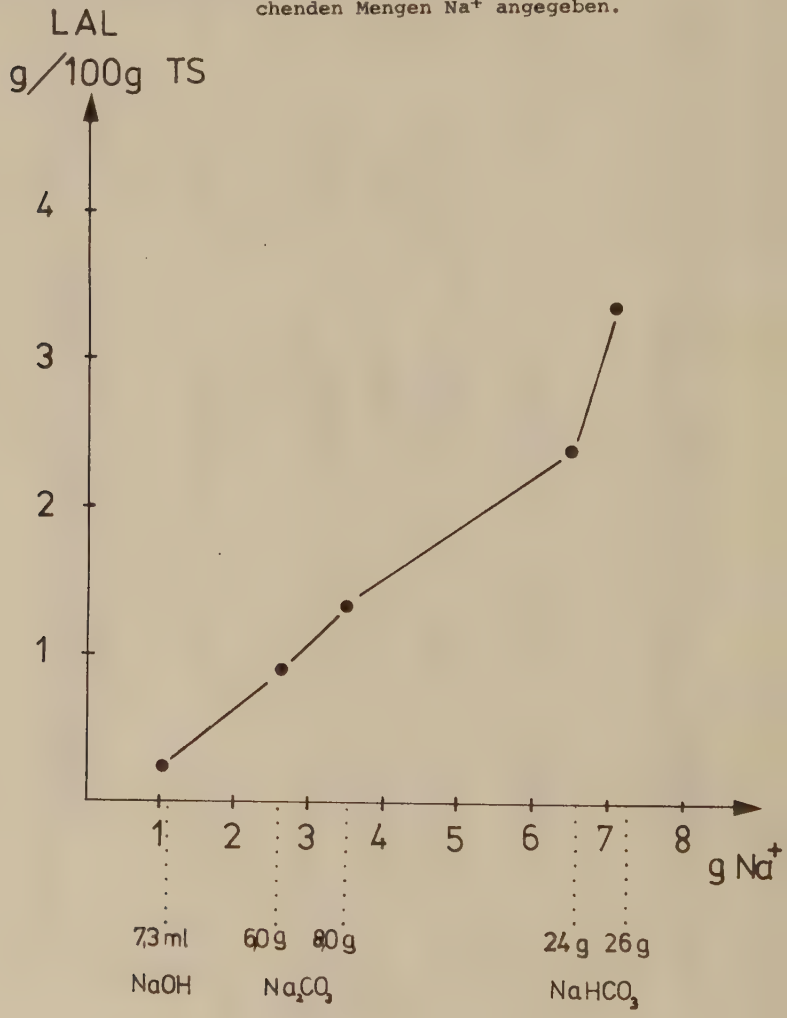
Lauge		Threonin %	Serin %	Lysinoalanin %	Lysin %	Arginin %
NaOH		3.0 3.3 4.2 4.0	4.6 4.7 5.3 5.3	0.27 0.32 0.16 0.19	7.0 8.0 7.7 7.9	3.3 3.4 3.4 3.5
	$\bar{x}$	**3,6**	**4,9**	**0,23**	**7,6**	**3,4**
Na_2CO_3		3.6 3.5 4.0 3.8	4.6 4.5 5.0 4.8	0.95 1.32 0.89 0.86	7.0 7.1 6.9 7.1	3.5 3.6 3.3 3.4
	$\bar{x}$	**3,7**	**4,7**	**1,02**	**7,1**	**3,4**
$NaHCO_3$		3.9 3.5 3.7 3.5	4.9 3.6 3.9 3.9	2.25 3.36 2.34 2.56	6.0 5.6 5.5 5.4	3.3 3.2 3.0 3.1
	$\bar{x}$	**3,5**	**4,1**	**2,68**	**6,1**	**3,4**

Tabelle 9: Säurekasein, ca. 90 % Wassergehalt; Proben durch Zugabe v. NaOH, Na_2CO_3 oder $NaHCO_3$ jeweils mit der gleichen Menge Natrium (1.05 g) versetzt. Offene Erhitzung 24 Stunden lang bei 90°C.

Lauge	pH	Threonin %		Serin %		Lysinoalanin %		Lysin %		Arginin %	
NaOH	7.0	3.5	3.9	5.2	5.3	0.07	0.13	7.8	8.0	3.4	3.1
Na_2CO_3	6.4	3.5	3.9	5.4	5.3	0.09	0.15	7.8	7.9	3.3	3.6
$NaHCO_3$	6.3	3.5	4.0	5.3	5.5	0.09	0.12	7.7	8.0	3.3	3.7

Abbildung 12:

Säurekasein ca. 90 % Wassergehalt, pH-Wert 7. Bildung von Lysinoalanin in Abhängigkeit von der Natrium-Menge, die zur pH-Wert-Einstellung mit NaOH, Na_2CO_3 bzw. $NaHCO_3$ verbraucht wurde. Die Erhitzung der Proben erfolgte für 24 Stunden bei 90°C. Der jeweilige Verbrauch an Lauge ist zu den entsprechenden Mengen Na^+ angegeben.



bei 90°C 24 Stunden lang erhitzt und ebensolange bei 50°C (18 mmHg) nachgetrocknet.

Die Lysinoalanin-Konzentrationen, die sich in diesen Kaseinproben bildeten, lagen in vergleichbarer Höhe (s. Tabelle 9).

4. Diskussion

Als Analysenmethode für die in vorliegender Arbeit geplanten Untersuchungen wurde von Anfang an die Ionenaustauschchromatographie nach dem Einsäulenverfahren vorgesehen. Das besonders von Sternberg (80) propagierte Dünnschichtverfahren ist, wenn auch nicht so genau, empfindlicher und in der Anwendung einfacher und wäre als Alternativmethode sicherlich in Frage gekommen. Die Ionenaustauschchromatographie an den heute handelsüblichen "Aminosäurenanalysatoren" hat jedoch den Vorteil, daß es sich hier um ein für die Trennung von Aminosäuren spezialisiertes und damit auch spezifisches Verfahren handelt. Es war überdies erwünscht und war nur mit diesem Verfahren realisierbar, daß neben dem Lysinoalanin verschiedene andere Aminosäuren gleichzeitig bestimmt werden können und daß Lysinoalanin von Aminozuckern und von den während der Hydrolyse aus Fruktoselysin entstehenden Produkten Furosin und Pyridosin (14) abgetrennt wird. Die Empfindlichkeit der modernen Anlagen zur Kurzzeitanalyse erschien ausreichend, die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens ist konkurrenzlos. Bei der früher üblichen LAL-Analyse (13,20) an der kurzen Chromatographiesäule (sog. Zweisäulenverfahren) war die Abtrennung insbesondere von Ornithin, Tryptophan und LAL zu schwierig, weshalb von uns das modernere Einsäulenverfahren gewählt wurde.

Das an den Aminosäurenapparaturen zum Beginn der vorliegenden Arbeit übliche, vom Gerätehersteller empfohlene Trennungsprogramm mit drei Pufferlösungen (pH-Wert: 3.20; 3.45; 4.00 ; Na^{+}-Normalität: 0.18; 0.80; 1.60) erwies sich jedoch für die LAL-Analyse als nicht geeignet. Die basischen Aminosäuren wurden hier sehr kurz nacheinander eluiert, so daß Überlagerungen von ninhydrinpositiven Substanzen

unvermeidlich waren.

Im Jahr 1976 veröffentlichte P. Slump zwei Methoden zum chromatographischen Nachweis von Lysinoalanin (75). Die erste enthielt ein spezielles LAL-Programm, bei dem an einer Säule (50 x 0.9 cm) mit nur einem Puffer (pH 4.5, 0.61N Na^+) Hydroxylysin und Galaktosamin von LAL vollständig getrennt wurden. Es traten jedoch Überlagerungen von Lysinomethylalanin (einem Produkt aus Methyldehydroalanin, das nach β-Elimination aus Threonin entsteht, und aus Lysin), Ornithinoalanin und Hydroxylysin auf.

Nach der zweiten von Slump vorgeschlagenen Methode wurde an einer Säule (50 x 0.9 cm) mit vier Puffern mit den pH-Werten 3.45 (0.2N Na^+), 4.25 (0.2N Na^+), 6.28 (1.03N Na^+) und 6.28 (1.2N Na^+) eluiert. Die Temperatur blieb konstant bei 56°C.

Dieses zweite Einsäulenverfahren war der bei uns üblichen Analysenmethode ähnlicher, so daß wir es als Grundlage für die Erarbeitung eines eigenen Vier-Puffer-Programms heranzogen. Dabei wurde der Puffer B genau nach der Vorschrift von Slump hergestellt (pH 4.25, 0.2N Na^+). Die Puffer C und D wichen etwas von den Pufferlösungen bei Slump ab (pH 6.10, 0.95N Na^+ bzw. pH 6.28, 1.05N Na^+). Der Puffer A wurde vom bisherigen eigenen Verfahren leicht abgewandelt übernommen (pH 3.16, 0.16N Na^+). Die Säulentemperatur wechselte in unserem Verfahren von 48° über 55° auf 66°C. Alle diese Modifikationen ergaben sich im Verlaufe umfangreicher Vorversuche zur Optimierung des Trennverfahrens, insbesondere zur gesicherten Abtrennung von Diaminopimelinsäure und Methionin sowie Hydroxylysin und Lysinoalanin. Sie waren wegen der unterschiedlichen apparativen Systeme bei Slump (50 x 0.9 cm Säule) und bei uns (21 x 0.6 cm Säule) zu erwarten gewesen. Deshalb war

auch bei uns die Reihenfolge der Aminosäuren gegenüber der Version von Slump geändert. Während die Elutionsfolge bei Slump Glukosamin, Galaktosamin, Lysinoalanin, Histidin, Hydroxylysin, Ornithin, Lysin und Ammoniak war, lautete die Reihenfolge bei uns Glukosamin, Galaktosamin, Hydroxylysin, Lysinoalanin, Lysin, Histidin und Ammoniak.

Wie Abbildung 4 S.28 zeigte, läßt sich LAL gut von den übrigen Verbindungen abtrennen. Die Analysen verliefen bisher bei Gehalten über 100 ppm störungsfrei. Bis etwa 10 ppm war eine halbquantitative Bestimmung möglich, obwohl in den Chromatogrammen großtechnisch hergestellter Kaseinproben zum Teil Doppelpeaks, verbreiterte oder schiefe Peaks auftraten. Als mögliche Ursache hierfür sind die verschiedenen Isomere des Lysinoalanins wie L-L-, L-D-LAL, D-L-, D-D-LAL (37 , 85) oder Lysinomethylalanin (75) zu nennen. Abtrennungsversuche für diese Substanzen sind von uns bisher noch nicht unternommen worden. Diese Störsubstanzen machen sich, wie bereits erwähnt, vorwiegend bei relativ geringen LAL-Gehalten bemerkbar. Aus diesem Grunde wurde von uns die Grenze für einen gesicherten Nachweis von LAL generell auf 100 ppm festgelegt, obwohl sich in vielen Proben auch geringere Gehalte noch störungsfrei nachweisen lassen. In strittigen Fragen wird außerdem jedesmal durch Zusatz von reinem LAL die Lokalisation des Lysinoalanins überprüft.

Neben dem Lysinoalanin und seinen verwandten Verbindungen können nach Einwirkung von Hitze und Alkali auf Proteine auch andere Aminosäurenderivate auftreten. Durch schwache oder starke Basen wird Arginin zu Ornithin und/oder Citrullin abgebaut. Die δ-Aminogruppe des Ornithins kann mit Dehydroalanin zu Ornithinoalanin reagieren (97). Während Ornithin unmittelbar vor dem Lysin eluiert wird, erscheinen nach Finley und Friedman an der kurzen Säule (Zwei-

säulenverfahren) Lysinoalanin und Ornithinoalanin fast an einer Stelle - meist als Doppelpeak (30). Bei der unserem Verfahren viel näherstehenden Methode von Slump wird jedoch das Ornithinoalanin kurz vor dem Lysinoalanin eluiert (75).

Bei den eigenen Untersuchungen über die Lysinoalaninbildung in Modellgemischen erschienen in den Chromatogrammen von Kaseinproben (pH 11), die bei 70°C erhitzt worden waren, unmittelbar vor dem Lysinoalanin mehrere (zumeist zwei), völlig abgetrennte Peaks. Eine Identifizierung war bisher nicht möglich. Leider stand uns kein Ornithinoalanin für die Prüfung dieser Frage zur Verfügung. Es ist jedoch zu vermuten, daß es sich bei dem kurz vor dem LAL eluierten, stets viel kleineren Peak, um Ornithinoalanin handelte. Bei dem zweiten Peak könnte es sich um ninhydrinpositive Substanzen aus Reaktionen von Dehydroalanin mit einer weiteren Aminosäure handeln. So hat man festgestellt, daß synthetisierte Dehydroalaninderivate von Histidin, Arginin und Kynurenin (28) oder Verbindungen von Pyruvat, das aus Dehydroalanin entstanden ist, mit Tryptophan (36) in Nachbarschaft zum Lysin eluiert werden (30).

Obwohl aus dem bisher Gesagten hervorgeht, daß in der LAL-Analytik noch einige Fragen offen sind, bleibt festzuhalten, daß es erst durch die Entwicklung und Modifikation des neuen Programms möglich geworden ist, in Proteinen neben den natürlich vorkommenden basischen Aminosäuren weitere Produkte nachzuweisen. Durch den Einsatz des zusätzlichen Elutionspuffers wurde der fragliche Bereich zwischen Phenylalanin und Lysin beträchtlich erweitert. In unserem früheren Drei-Puffer-Programm betrug die Zeit zwischen diesen beiden Aminosäuren nur fünf min., wobei noch Ammoniak dazwischenlag. Durch das Einschalten der vierten Pufferlösung konnte der Zwischenraum dagegen auf

25 min. verlängert werden. Die Identifizierung der bisher noch unbekannten Peaks ist im wesentlichen ein Problem der Verfügbarkeit von reinen Vergleichssubstanzen und damit eine Frage der Zeit.

Vor Beginn der Untersuchungen an Modellproteinen wurde ermittelt, welche Faktoren auf die LAL-Freisetzung Einfluß nehmen. Von Bohak war 1964 berichtet worden, daß der LAL-Gehalt aus alkalibehandelter RNase beim Kochen mit Salzsäure bis zu 72 Stunden zunahm (13). Sternberg und Kim dagegen fanden, daß die Freisetzung des Lysinoalanins aus Sojaprotein bei 24 Stunden das Maximum erreichte und die Werte anschließend wieder abfielen (80). In dem von uns untersuchten Säurekasein stieg der Betrag an LAL, der durch das Kochen mit Salzsäure aus dem Proteinverband gelöst wurde, über 24 Stunden hinaus bis zu 48 Stunden in geringem Maße weiter an. Der LAL-Wert nach 24 Stunden war aber ausreichend hoch, so daß bei Bestimmung der übrigen Aminosäuren in einer Probe für LAL ein gesonderter Hydrolysenansatz nicht notwendig erscheint. Die Erhöhung der üblichen 6N Konzentration der Salzsäure auf 7 bzw. 8 N hatte keinen ausgeprägten Einfluß auf die Lysinoalaninausbeute; damit ist zum Beispiel eine einzige Hydrolyse für die Analyse von LAL und Furosin, die mit 7.8N Salzsäure erfolgt, möglich.

Die Untersuchungen über eine pH-Wert abhängige Lysinoalaninentstehung in isoliertem Sojaprotein sowie in Säurekasein zeigen, daß bei hohen Temperaturen (90°, 110°C) die Bildung von LAL zwar bereits im sauren pH-Bereich abläuft, die Gehalte hier aber allgemein gering bleiben. Bei Einwirkung niedrigerer Temperaturen (70°C) auf Säurekasein ist selbst bis zu schwach basischen pH-Werten dieses Quervernetzungsprodukt nicht nachzuweisen. Erst in ausgesprochen alkalischem Milieu entstehen bei 70°, 90° und 110°C im Säurekasein größere Mengen an LAL. Diese überschreiten weit die Konzentrationen, die nach denselben Bedingungen (pH 8-10, 110°C) im Sojaprotein gemessen wurden.

Während im Kasein die Gehalte von Threonin und Serin als möglichen Ausgangssubstanzen des Dehydroalanins (DHA) mit zunehmendem LAL sinken, wurde bei den eigenen Untersuchungen im Sojaprotein keine signifikante Änderung dieser Aminosäuren ermittelt. Dieses Ergebnis wäre, ebenso wie die Tatsache, daß sich im Sojaprotein viel weniger LAL bildete als im Kasein, damit zu erklären, daß das Dehydroalanin in den beiden Eiweißträgern aus verschiedenen Substanzen entsteht.

Im Säurekasein, einem Phosphoprotein, ist die Ausgangsverbindung für das Dehydroalanin wahrscheinlich in der Hauptsache o-Phosphoryl-Serin. Der Kasein-Komplex besteht aus drei Hauptkomponenten, dem α_s-Kasein, das selbst eine Mischung verschiedener Phosphoproteine ist (2), dem β-Kasein und dem κ-Kasein in einem ungefähren Verhältnis von 50 %:35%:15%. Die Phosphatgruppen der Kaseine liegen im allgemeinen als Ester der Hydroxyaminosäuren vor. Gerade für das β-Kasein weiß man, daß der größte Teil des Phosphats an Serin gebunden ist (48). Die Hydroxyaminosäuren sind besonders leicht angreifbar, wenn sie mit Phosphorsäure- bzw. Zuckerresten substituiert sind (60 , 35). Beim Erhitzen von Kasein in alkalischer Lösung kommt es so unter Elimination von anorganischem Phosphat aus den Phosphoserylresten zur Bildung von Dehydroalanin (49 , 50). Beim Threonin des Säurekaseins liegt eine o-Substituierung nicht vor. Wie aus den eigenen Befunden hervorgeht (s. Tabelle 6 , Abbildung 5 u.7) entsprach tatsächlich in den untersuchten Modell-Kaseinen die Bildung von LAL mengenmäßig der Abnahme des Serins (und des Lysins). Die Werte des Threonins fielen hier nie so steil ab.

Im Sojaprotein dagegen war vornehmlich das Cystin die Vorstufe des Dehydroalanins. Im Gegensatz zu Säurekasein,

das nur ca. 0.3 % Cystin enthält, hat isoliertes Sojaprotein immerhin einen Anteil von ca. 1.5 %. Wenn man berücksichtigt, daß bei der β-Elimination des Cystins das Dehydroalanin zunächst bevorzugt aus einer Cysteinhälfte entsteht, entspricht dies etwa 0.55 % Dehydroalanin, woraus ca. 1.5 % Lysinoalanin gebildet werden können. Der in den eigenen Untersuchungen an dem Sojaprotein ermittelte Höchstgehalt an LAL betrugt 1.2 %, was bei Berücksichtigung der unkontrollierbaren Reaktionsmöglichkeiten und -abläufe in brauchbarer Übereinstimmung zu dem theoretischen Richtwert steht. Die Bestimmung des Cystingehaltes in den Sojaproben war bisher aus labortechnischen Gründen nicht möglich, so daß der tatsächliche Cystinabfall nicht gemessen wurde. Für das Lysin wurde mit steigendem LAL-Gehalt keine signifikante Abnahme beobachtet. Das mag daran liegen, daß bei dem relativ hohen Ausgangsgehalt an Lysin durch derart niedrige LAL-Werte hervorgerufene Veränderungen schwer nachzuweisen sind.

Anders war dies im Säurekasein. Neben dem Absinken von Threonin und Serin fielen auch die Konzentrationen des Lysins und des Arginins deutlich mit der Zunahme von Lysinoalanin in den Proben ab. Ebenso wie beim Threonin liegt für das Arginin hier offensichtlich eine Scheinkorrelation vor.

Die Abhängigkeit der Lysinoalaninbildung vom Wassergehalt der Proteine bzw. der Proteinkonzentration einer Probe (s. Abbildung 10) ist verständlich, da es mit dichterer Lagerung der Proteine zur Zusammenführung möglicher Reaktionspartner kommt. Es können vermehrt intermolekulare Quervernetzungen auftreten. In Proben mit hohem Wasseranteil hingegen reagieren nur die Reste miteinander, die in der Aminosäurensequenz unmittelbar

nebeneinander liegen. Aus diesem Grund sind auch LAL-Beträge in Proben mit gleichem Ausgangs-Wassergehalt dann höher, wenn offen erhitzt wurde, da hier, im Gegensatz zu geschlossener Erhitzung, durch Wasser-Verdunstung die oben genannten günstigeren Reaktionsbedingungen auftreten.

Bei Verwendung von NaOH, Na_2CO_3 oder $NaHCO_3$ für die Alkalisierung von Kasein scheint sich die LAL-Bildung direkt nach der zugeführten Menge an Na^+-Ionen zu richten. In Lösungen, die den gleichen pH-Wert hatten, war nach Trocknung umso mehr LAL aufgetreten, je mehr Natrium verbraucht worden war. Bei gleicher Menge Na^+ wurden trotz der unterschiedlichen pH-Werte (verschiedene Laugen) vergleichbare Beträge an LAL gefunden. Die Wirkung anderer Kationen auf den Lysinoalanin-Ertrag wurde von Creamer und Matheson beschrieben (19). Sie untersuchten Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Br^{2+}, Al^{3+} und La^{3+} und fanden, daß zum Beispiel mit $CaCl_2$ in Kasein bei niedrigerem pH-Wert schneller und mehr LAL auftrat als ohne das Kalzium in Proben mit höheren pH-Werten.

Die Wirkung der unterschiedlichen Erhitzungstemperaturen auf die Lysinoalaninbildung in Säurekasein war unerwartet. Toulupis et al. (86) hatten im Verlauf von Untersuchungen über die Entstehung von Lysinoalanin in Wolle berichtet, daß die LAL-Konzentration bei pH 10.85 mit bei der Hitzebehandlung steigender Temperatur zunahm. Nach den vorliegenden eigenen Befunden jedoch wurde im Säurekasein bei gleicher Erhitzungszeit im Bereich hoher pH-Werte (pH 10, 11 und 12) mehr LAL gefunden, wenn die Erhitzungstemperatur 70°C statt 90° bzw. 90°C statt 110°C betrug. Dies deutet darauf hin, daß es bei Alkalibehandlung durch intensive Hitzeeinwirkung neben der Bildung von LAL zunehmend auch zu dessen Zerstörung kommt. Die Unterschiede

zu den Ergebnissen von Toulupis mögen dadurch aufgetreten sein, daß die LAL-Konzentration in Wolle jeweils bereits nach einstündiger Erhitzung gemessen wurde. In einem derart kurzen Zeitraum aber ist eventuell eine Zerstörung der Verbindung durch die höheren Temperaturen noch nicht nachzuweisen. Den eigenen Befunden nach zu urteilen wäre, im Gegensatz zu verschiedenen Vorschlägen, das Lysinoalanin nur bedingt als Parameter für Hitze- bzw. Alkalischäden geeignet. Ein besseres Maß für Alkalischäden könnte die Bildung von Ornithin aus Arginin sein, dessen Entstehen der Behandlungsweise proportional sein soll (69).

Die eigenen Versuche zur Auswirkung der Erhitzungszeit auf den Betrag an LAL in Säurekasein lassen vermuten, daß - ähnlich wie bei der Erhöhung der Temperatur - nach einer gewissen Zeit die Zerstörung von bereits vorhandenem LAL schneller als dessen Neubildung abläuft. Daß die Lysinoalanin-Konzentration auch mit steigender Erhitzungsdauer abnehmen könnte, ist erst in der letzten Zeit diskutiert worden (38). Zuvor wurde stets davon berichtet, daß sich in den untersuchten Proteinen mit Verlängerung der Hitze- und damit Alkalieinwirkung die Verbindung zunehmend bildete (z.B. 13).

Der Vorwurf, daß die in Modellversuchen unter relativ extremen Erhitzungsbedingungen nachgewiesenen LAL-Mengen nicht praxisrelevant seien, wird durch diese Ergebnisse wenigstens teilweise entkräftet. Unter den "milden" Konditionen, die bei der Herstellung vieler Nahrungs- und Futtermittel angewendet werden, kann es unter Umständen zu erheblichen LAL-Werten kommen. Eigene Untersuchungen an zahlreichen Lebensmitteln aus dem Handel sowie an speziellen Nahrungsbestandteilen und -präparationen, über die im Rahmen dieser Arbeit nicht ausführlich berichtet

werden kann, bestätigen dies zum Teil. So wiesen Kaseinate (70 Proben, teilweise Versuchschargen) Lysinoalaningehalte bis zu 3700 ppm Lysinoalanin im Rohprotein auf. Andere Nahrungsmittel enthielten dagegen relativ geringe LAL-Gehalte, wie z.B. Kondensmilch (100 - 200 ppm i. RP), Schmelzkäse (Spuren) oder Schokoladen (kein LAL). Von anderer Seite werden allerdings für verschiedene Nahrungsmittel in den USA hohe LAL-Gehalte angegeben (Sternberg 1975) (81). Da jedoch viele der dort nach dem Dünnschichtverfahren untersuchten Proben hier noch nicht analysiert sind und auch die Nahrungstechnologie teilweise unterschiedlich ist, lassen sich diese Befunde aus den USA nicht ohne weiteres auf unsere Verhältnisse übertragen.

Abschließend kann festgestellt werden, daß ohne Zweifel die Nahrungstechnologie einen großen Einfluß auf die Bildung von Lysinoalanin hat. Da die Entstehung dieses Quervernetzungsproduktes aus ernährungsphysiologischer und toxikologischer Sicht unerwünscht ist, sollte man die Produktion von Nahrungs- und Futtermitteln oder Nahrungsmittelkomponenten so einrichten, daß die Lysinoalaninwerte möglichst gering gehalten werden. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es somit nicht nur, zu untersuchen, wann und wie Lysinoalanin entsteht, sondern auch herauszufinden, unter welchen Bedingungen es nicht oder in geringeren Mengen gebildet wird.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst eine Methode vorgestellt, die für die Bestimmung von Lysinoalanin (LAL=N^{ε}-(2-amino-2-carboxyäthyl)-L-Lysin) am Aminosäurenanalysator entwickelt wurde. Nach dem sogenannten Einsäulenverfahren wird die Verbindung mit Hilfe eines Vier-Puffer- und Drei-Temperaturen-Programms von allen übrigen bisher geprüften ninhydrinpositiven Substanzen gut abgetrennt und quantitativ bestimmt. Die Analysenzeit für die Bestimmung des Lysinoalanins zusammen mit allen anderen Aminosäuren betrug einschließlich Regeneration und Equilibrieren 160 Minuten. Über 100 ppm Lysinoalanin verlief die Analyse störungsfrei, bis 10 ppm war eine halbquantitative Bestimmung möglich.

Die für Proteine üblicherweise angewendete Hydrolysenmethode (Kochen mit 6normaler Salzsäure für 24 Stunden am Rückfluß) erwies sich auch im Hinblick auf die Freisetzung von LAL als günstig. Eine 5N Salzsäure war für die Lösung des Lysinoalanins aus dem Proteinverband nicht stark genug. Bei Hydrolyse mit 6, 7 und 8normaler Salzsäure zeigte sich kein wesentlicher Unterschied.

Untersuchungen über die Bildung von Lysinoalanin in isoliertem Sojaprotein, Säurekasein oder Natrium-Kaseinat zeigten, daß in den verschiedenen Eiweißträgern das LAL pH-Wert-abhängig entsteht. Vom sauren zum alkalischen pH-Bereich zunehmend kommt es unter Hitzeeinfluß zu immer höheren Konzentrationen von Lysinoalanin. Dieser Anstieg war zum Beispiel in Säurekasein bei 90°C (24 h) mit einer Wahrscheinlichkeit $p \leq 0.01$ signifikant. Die Aminosäuren Threonin, Serin, Lysin und Arginin fielen gleichzeitig (in signifikanter negativer Korrelation zum LAL) ab. Der Gehalt an Lysinoalanin in Säurekasein war nach gleichen

Erhitzungsbedingungen (24 Stunden bei 110°C) stets etwa um das Zehnfache höher als der im Sojaprotein. Erstaunlicherweise enthielten im stark alkalischen Milieu die bei 110°C erhitzten Kaseinproben weniger LAL als die bei 90°C erhitzten Kaseine. Den absolut höchsten LAL-Gehalt wies mit 4.7 % in der Trockensubstanz eine bei pH 11 und 70°C 24 Stunden lang erhitzte Kaseinprobe auf.

Mit steigender Erhitzungsdauer erhöhte sich die Konzentration an LAL bis zu 12 Stunden und nahm anschließend (bis 24 Stunden untersucht) wieder ab.

Bei hohem Wassergehalt einer Probe bildete sich durch Erhitzen weniger Lysinoalanin als in konzentrierten Eiweißlösungen. So entstand auch in gleichen Kaseinlösungen dann mehr LAL, wenn sie, im Gegensatz zu geschlossener Erhitzung, offen getrocknet worden waren, da hier das Eiweiß durch die Wasserverdunstung stärker konzentriert wurde.

Bei Alkalisierung von Kaseinlösungen mit NaOH, Na_2CO_3 oder $NaHCO_3$ stieg die Lysinoalaninkonzentration um so höher, je größer die vor der Erhitzung mit der jeweiligen Lauge zugegebene Menge an Natrium war.

Die Ergebnisse werden Befunden aus der Literatur gegenübergestellt und in ihrer Bedeutung für die Nahrungstechnologie sowie die Analytik in Nahrungs- und Futtermitteln diskutiert.

6. Summary

Formation of Lysinoalanine in Heat Treated Proteins

In the present work, a method is shown which has been developed for the determination of lysinoalanine (LAL=N^{ε}-(2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine) with an automatic amino acid analyzer. Using a single column 4-buffer- and 3-temperature-programe the compound is well separated from all ninhydrinpositive compounds testet until now. The analysis of LAL and all other amino acids needed, including regeneration and equilibration, 160 minutes. Above 100 ppm the determination was quantitative, above 10 ppm semiquantitative.

The method of hydrolysis normally used with proteins (samples for 24 h kept at boiling temperature with 6 N hydrochloric acid) proved to be sufficient for the liberation of lysinoalanine. 5N hydrochnloric acid was not strong enough for LAL-liberation. Hydrolysis with 6,7 or 8N hydrochloric acid did not show significant differences.

Examinations of the lysinoalanine formation in isolated soy protein, acid casein and sodium-caseinat showed that in these proteins LAL forms as a function of the pH. Under the influence of heat, the lysinoalanine concentration increased with increasing pH. In acid casein, heated at 90°C, for instance, this rise had a significance of $p \leq 0.01$. At the same time, the concentrations of threonine, serine, lysine and arginine decreased with significant negative correlation to the LAL. Under equal conditions (heating at 110°C for 24th, same pH) the amount of LAL in acid casein was nearly always tenfold to that in isolated soy protein.

Unexpectedly at high pH (pH 10,11,12) the casein samples heated at 110°C had less LAL than those heated at 90°C.

The absolute highest amount of LAL, that is 4,7 g/100 g dry matter, was found in a casein sample with pH 11, which had been heated at 70°C for 24h.

With increasing time of heating, the concentration of lysinoalanine increased up to 12h and decreased in the following time up to 24h.

When samples with a high content of water were heated, less LAL formed than in more concentrated protein solutions. Thus, in casein solutions more LAL was developed when heated in enamel basins than in closed tins because of the concentrating of protein by water evaporation in the open heated samples.

By alkalizing casein solutions with NaOH, Na_2CO_3 or $NaHCO_3$ the lysinoalanine-concentration increased more with more Na^+-ions which had been added with the respective lye.

The findings of the studies are compared with results from literature and discussed in their significance for food technology and for analysis in food and feed.

Literaturverzeichnis

1. Almquist, H.J., H.L. Christensen, S. Maurer (1966), Sulfid Liberation from Raw Soybean Protein, Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 122, 913

2. Annan, W.D., W. Manson (1969), A Fractionation of the α_1-Casein Complex of Bovine Milk J. Dairy Res. 36, 259

3. Asquith, R.S., A.K. Booth, J.D. Skinner (1969), The Formation of Basic Amino Acids on Treatment of Proteins with Alkali Biochim. Biophys. Acta 181, 164

4. Asquith, R.S., M.S. Otterburn, B.L. Gardner (1971), The Identification of N^{ε} (β-L-Asparty1)-L-lysine in Native and Heated Keratin Experientia 27, 1388

5. Asquith, R.S., P. Carthew (1972a), An Investigation of the Mechanism of Alkaline Degradation of Cystine in Intact Protein, Biochim. Biophys. Acta 278, 8

6. Asquith, R.S., M.S. Otterburn (1977), Cystine Alkali Reactions in Relation to Protein Crosslinking, in: Protein Crosslinking-Nutritional and Medical Consequences (M. Friedman, ed.), Plenum Press, New York - London, p. 93

7. Atfield, G.N., C.J.O.R. Morris (1961), Analytical Separations by High-Voltage Paper Electrophoresis Biochem. J. 81, 606

8. Van Beek, L., V.J. Feron, A.P. De Groot (1974), Nutritional Effects of Alkali-Treated Soyprotein in Rats J. Nutr. 104, 1630

9. Bjarnason, J., U.K. Carpenter (1969), Mechanism of Heat Damage in Proteins, I. Models with Acylated Lysine Units, Br. J. Nutr. 23, 859

10. Bjarnason, J., U.K., Carpenter (1970), Mechanism of Heat Damage in Proteins, 2. Chemical Changes in Pure Proteins, Br. J. Nutr. 24, 313

11. Blanchard, M., D.E. Green, V. Nocito, S. Ratner (1944), L-Amino Acid Oxidase of Animal Tissue J. Biol. Chem. 155, 421

12. Boggs, R.W. (1978), Bioavailability of Acetylated Derivatives of Methionine, Threonine and Lysine, in: Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins (M. Friedman, ed.) Plenum Press, New York - London, p. 571

13. Bohak, Z. (1964), N^{ε}-(DL-2-Amino-2-Carboxyethyl)-L-Lysine, a New Amino Acid Formed on Alkaline Treatment of Proteins J. Biol. Chem. 239, 2878

14. Brandt, A., H. Erbersdobler (1972). Zur Bestimmung von Furosin in Nahrungs- und Futtermitteln Landwirtsch. Forsch., 28/II, Sonderheft 115

15. Brandt, A. (1978), Untersuchungen zum Transport von Fructose-Aminosäuren; ein Beitrag zur ernährungsphysiologischen Charakterisierung der Maillard-Reaktion,Agr. Diss. München-Göttingen

16. Brüggemann, J., H. Erbersdobler (1968), Fructoselysin als wichtigstes Reaktionsprodukt von Lysin mit Glucose bei Hitzeschädigung von Lebens- und Futtermitteln Z. Lebensmittelunters. u. Forschung 137, 137

17. Butler, W.H., M. Greenblatt, W. Lijinsky (1969), Carcinogenesis in Rats by Aflatoxin B_1, G_1+B_2

Cancer Res. 29, 2206

18. Carter, C.E. and J.P. Greenstein (1946), A Spectrophotometric Method for the Determination of Dehydropeptidase Activity J. Biol. Chem. 165, 725

19. Creamer, L.K. and A.R. Matheson (1977), Action of Alkali on Casein N.Z. J l. Dairy Sci. Technol. 12, 253

20. De Groot, A.P., and P. Slump (1969), Effects of Severe Alkali Treatment of Proteins on Amino Acid Composition and Nutritive Value J. Nutr. 98, 45

21. De Groot, A.P., P. Slump, V.J. Feron, L. Van Beek (1976), Effects of Alkali-treated Proteins: Feeding Studies with Free and Protein-bound Lysinoalanine in Rats and other Animals
J. Nutr. 106, 1527

22. Erbersdobler, H., und H. Zucker (1966), Untersuchungen zum Gehalt an Lysin in Trockenmagermilch
Milchwissenschaft 21, 564

23. Erbersdobler, H. (1966), Ergebnisse zur Qualitätsbeurteilung der Trockenmagermilch
Landw. Forschg. 19, 264

24. Erbersdobler, H. (1967), Untersuchungen zur analytischen und physiologischen Charakterisierung der Aminosäurenschädigung bei Hitzebehandlung von Nahrungs- und Futtermitteln
Habilitationsschrift München

25. Erbersdobler, H. (1970), Zur Schädigung des Lysins bei der Herstellung und Lagerung von Trockenmilch
Milchwissenschaft 25, 280

26. Erbersdobler, H. (1976), Amino Acid Availability, in: Protein Metabolism and Nutrition (D.J.A. Cole, K.N. Boorman, P.J. Butterly, D. Lewis, R.J. Neale and H. Swan, ed.), Butterworth, London - Boston, p. 139

27. Erbersdobler, H.F., A.B. Holstein und E. Lainer (1979), Gleichzeitige Bestimmung von Lysin, Lysinoalanin, Furosin und Pyridosin in Lebens- und Futtermitteln
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 168, 6

28. Finley, J.W. and M. Friedman (1973), New Sweetening Agents: N-formyl and N-acetylkynurenine
J. Agr. Food Chem., 33

29. Finley J.W., J.T. Snow, P.H. Johnston and M. Friedman (1977), Inhibitory Effect of Mercaptoamino Acids on Lysinoalanine Formation During Alkali Treatment of Proteins, in: Protein Crosslinking - Nutritional and Medical Consequences (M. Friedman, ed.) Plenum Press, New York - London, p. 85

30. Finley, J.W. and M. Friedman (1977), New Amino Acid Derivatives formed by Alkaline Treatment of Proteins, in: Protein Crosslinking-Nutritional and Medical Consequences (M. Friedman, ed.) Plenum Press, New York - London, p. 123

31. Finot, P.A., J. Bricout, R. Viani, J. Mauron (1968), Identification of a New Lysine Derivative obtained upon Acid Hydrolysis of heated Milk
Experientia 24, 1097

32. Finot , P.A., R. Viani, J. Bricout, J. Mauron (1969), Detection and Identification of Pyridosine, a Second Lysine Derivative obtained upon Acid Hydrolysis of heated Milk
Experientia 25, 134

33. Finot, P.A., E. Bujard, M. Arnaud (1977), Metabolic Transit of Lysinoalanine (LAL) Bound to Protein and of Free Radioactive ^{14}C-Lysinoalanine,
in: Protein Crosslinking - Nutritional and Medical Consequences (M. Friedman, ed.) Plenum Press, New York - London, p. 51

34. Finot, P.A., F. Mottu, E. Bujard and J. Mauron (1978), N-Substituted Lysines as Sources of Lysine in Nutrition,
in: Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins (M. Friedman, ed.), Plenum Press, New York - London, p. 549

35. Freimuth, U., B. Schlegel, E. Gahner und H. Nötzold (1974), Die Bildung v. Lysinoalanin in Alkalibehandelten Milchproteinen
Die Nahrung 18, 1 K5 - K8

36. Friedman, M. and J.W. Finley (1975c), Evaluation of Methods for Tryptophan Analysis in Proteins,
in: Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds, Part I (M. Friedman, ed.) Dekker, New York, p. 423

37. Friedman, M. (1977), Crosslinking Amino Acids-Stereochemistry and Nomenclature,
in: Protein Crosslinking - Nutritional and Medical Consequences (M. Friedman ed.) Plenum Press, New York - London, p. 1

38. Friedman, M. (1978), Inhibition of Lysinoalanine Synthesis by Protein Acylation, in: Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins (Ed. by M. Friedman) Plenum Press, New York - London, p. 613

39. Gould, D.H. and J.T. MacGregor (1977), Biological Effects of Alkali-Treated Protein and Lysinoalanine: An Overview, in: Protein Crosslinking - Nutritional and Medical Consequences (Ed. by M. Friedman) Plenum Press, New York - London, p. 29

40. Grassmann, W. und K.v. Arnim (1934), Über die Reaktion des Ninhydrin mit Prolin und Oxyprolin Ann. Chem. (Liebig) 509, 288

41. Gross, E. (1977), α,β-Unsaturated and Related Amino Acids in Peptides and Proteins, in: Protein Crosslinking - Nutritional and Medical Consequences (Ed. by M. Friedman) Plenum Press, New York - London, p. 131

42. Hard, G.C., W.H. Butler (1971), Morphogenesis of Epithelial Neoplasms Induced in Rat Kidney by Dimethylnitrosamine, Canc. Res. 31, 1496

43. Hartford, C.G. and G. W. Studebaker (1972), Determination of Lysinoalanine by Ion Exchange Chromatography, Informationsschrift, Miles Laboratories, Inc.

44. Heyns, K., J. Heukeshoven, K.H. Brose (1968), Abbau von Fructose-Aminosäuren zu N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren Angew. Chemie 80, 627

45. Horn, M.J., D.B. Jones, S.J. Ringel (1941), Isolation of a New Sulfur-Containing Amino Acid (Lanthionine) from Sodium Carbonate-Treated Wool J. Biol. Chem. 138, 141

46. Kruskal, Wallis (1952), H-Test, in: Sachs, L. (1973), Angewandte Statistik, Planung und Auswertung, Methoden und Modelle, p. 238

47. Leegwater, D.C. (1978), The Nephrotoxicity of Lysinoalanine in the Rat
Fd. Cosmet. Toxicol. 16, 405

48. Manson, W. and W.D. Annan (1971), The Structure of a Phosphopeptide Derived from β-Casein
Archs. Biochem. Biophys. 145, 16

49. Manson, W., T. Carolan (1972), The Alkali-Induced Elimination of Phosphate from β-Casein
J. Dairy Res. 39, 189

50. Manson, W. (1978), Aspects of the Value and the Limitations of Milk Protein as a Food Material
Proc. Nutr. Soc. 37, 217

51. Mauron, J. (1970), Le Comportement Chimique des Proteines lors de la Préparation des Aliments
J. Internat. Vitaminol. 40, 209

52. Mauron, J. (1972), Protein and Amino Acid Functions, Internat. Encyclopaedia of Food and Nutrition, Ed. by E.J. Bigwood, 2, 417

53. Mecham, D.K. and H.S. Olcott (1949), Phosvitin, the Principal Phosphoprotein of Egg Yolk
J. Am. Chem. Soc. 71, 3670

54. Moore, S., W.H. Stein (1948), Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids
J. Biol. Chem. 176, 367

55. Moore, S., W.H. Stein (1951), Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins
J. Biol. Chem. 192, 663

56. Moore, S., W.H. Stein (1954), Procedures for the Chromatographic Determination of Amino Acids on Four Per Cent Cross-linked Sulfonated Polystyrene Resins
J. Biol. Chem. 211, 893

57. Moore, S., W.H. Stein (1954), A Modified Ninhydrin Reagent for the Photometric Determination of Amino Acids and Related Compounds
J. Biol. Chem. 211, 907

58. Moore, S., D.H. Spackman and W.H. Stein (1958), Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins
Anal. Chem. 30, 1185

59. Naumann, K. und R. Bassler (1976), Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, Methodenbuch der VDLUFA III, 3. Aufl.; Hrsg. O. Siegel; Verlag J. Neumann - Neudamm

60. Nicolet, B.H., L.A. Shinn, L.J. Saidel (1942)
The Lability toward Alkali of Serine and Threonine in Proteins, and some of its Consequences
J. Biol. Chem. 142, 609

61. Okuda, T. und H. Zahn (1964), Synthese von N^{ε}-(2-Amino-2-carboxy-äthyl) -L-Lysin, einer neuen Aminosäure aus alkalibehandelter Wolle
Chem. Berichte 98, 1164

62. Otterburn, M.S., M. Healy and W. Sinclair (1977),
The Formation, Isolation and Importance of Isopeptides in Heated Proteins,
in: Protein Crosslinking-Nutritional and Medical Consequences (M. Friedman, ed.) Plenum Press, New York - London, p. 239

63. Patchornik, A., and M. Sokolowski (1963).
Nonenzymatic Cleavage of Peptide Chains at the Cysteine and Serine Residues through their Conversion into Dehydroalanine. I. Hydrolytic and Oxidative Cleavage of Dehydroalanine Residues
J. Am. Chem. Soc. 86a, 1206

64. Patchornik, A., M. Sokolowski (1963), V^{th} European Peptide Symposium Oxford, Pergamon Press, New York, p. 253
zitiert nach: Patchornik, A., M. Sokolowski (1964), Nonenzymatik Cleavages of Peptide Chains at the Cysteine and Serine Residues through their Conversion into Dehydroalanine, I. Hydrolytic and Oxidative Cleavage of Dehydroalanine Residues, J. Am. Chem. Soc., 86a, 1206

65. Patchornik, A. and M. Sokolowski (1964), Chemical Interactions between Lysine and Dehydroalanine in Modified Bovine Pancreatic Ribonuclease
J. Am. Chem. Soc. 86, 1860

66. Petry, H.P. (1967), Untersuchungen zur Methodik der automatischen Aminosäurenbestimmung am biologischen Material (studiert an der Aminosäurenzusammensetzung der Pansenpopulation von Rindern)
Med. vet. Diss. München

67. Pisano, J., J.S. Finlayson and M.P. Peyton (1968), Crosslink in Fibrin polymerized by Factor XIII: (γ-glutamyl)-lysine
Science 160, 892

68. Pollock, G.E., and L.H. Frommhagen (1968), The Extent of Racemization of some Amino Acids in Dilute Alkali-Treated Protein and Soil Humic and Fulvic Acid
Anal. Biochem. 24, 18

69. Provansal, M. (1974), Thêse. Academie de Montpellier. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, zitiert nach: Mauron, J. (1975), Ernährungsphysiologische Beurteilung verarbeiteter Eiweißstoffe, Dt. Lebensmittel-Rundschau, Sonderdruck aus Heft 1, p. 27

70. Provansal, M. (1975), Chemical and Nutritional Modification of Sunflower Proteins due to Alkaline Processing. Formation of Amino Acid Crosslinks and Isomerization of Lysine Residues
J. Agricult. Food. Chem. 23, 938

71. Ratner, S. (1955), Methods in Enzymology, in: S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Editors) Academic Press, Inc., New York, II, p. 204

72. Reyniers, J.P., J.C. Woodard, M.R. Alvarez (1974), Nuclear Cytochemical Alterations in α-Protein Induced Nephrocytomegalia
Lab. Invest 30, 582

73. Robson, A., M.J. Williams and J.M. Woodhouse (1967), Rapid Automatic Methods for the Determination of Lanthionine und Lysinoalanine using an Amino Acid Analyzer
J. Chromatog. 31, 284

74. Ruhemann, S. (1911), J. Chem. Soc. 99, 792, 1306, 1486 zitiert nach: Moore, S., W.H. Stein (1948), Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids, J. Biol. Chem. 176, 367

75. Slump, P. (1977), Determination of Lysinoalanine with an Automatic Amino Acid Analyzer
J. of Chromatography 135, 502

76. Spackman, D.H., W.H. Stein, S. Moore (1956), Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids, Federat. Proc. 15, 358

77. Spackman, D.H., W.H. Stein, S. Moore (1958), Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids, Anal. Chem. 30, 1190

78. Speakman (1933), The Structure of the Wool-Fibre, J. Soc. Dyers and Colourists 49, 180

79. Speakman (1933), Reactivity of the Sulphur-Linkage in Wool, Nature 132, 930

80. Sternberg, M., C.Y. Kim and R.A. Plunkett (1975), Lysinoalanine Determination in Proteins
J. of Food Science 40, 1168

81. Sternberg, M., C.Y. Kim and F.J. Schwende (1975), Lysinoalanine: Presence in Foods and Food Ingredients
Science 190, 992

82. Sternberg, M. and C.Y. Kim (1977), Lysinoalanine Formation in Protein Food Ingredients,
in: Protein Crosslinking-Nutritional and Medical Consequences (Ed. by M. Friedman) Plenum Press, New York - London, p. 73

83. Struthers, B.J., D.T. Hopkins, E.E. Prescher and R.R. Dahlgren (1978), Effects of Protein-Bound Lysinoalanine, N^{ε}-DL-(2-amino-2-carboxyethyl) L-lysine on Fetal and Neonatal Rats J. Nutr. 108, 954

84. Tannenbaum, S.R., H. Barth, J.P. Le Roux (1969), Loss of Methionine in Casein during Storage with Autoxidizing Methyl Linoleat, J. Agr. Food Chem. 17, 1353

85. Tas, A.C., and R.J.C. Kleipool (1976), The Stereoisomers of Lysinoalanine Lebensm.-Wiss. u. -Technol. 9, 360

86. Touloupis, C. and A. Vassiliadis (1977), Lysinoalanine Formation in Wool after Treatments with some Phosphate Salts, in: Protein Crosslinking-Nutritional and Medical Consequences (Ed. by M. Friedman) Plenum Press, New York - London, p. 187

87. Watanabe, K., H. Klostermeyer (1977), Bildung von Dehydroalanin, Lanthionin und Lysinoalanin beim Erhitzen von β-Lactoglobulin A Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 164, 77-79

88. Weber, G. (1972), Untersuchungen zur Aminosäurenverfügbarkeit bei hitzegeschädigten Proteinen Med. vet. Diss. München

89. Whitaker, J.R. and R.E. Feeny (1977), Behavior of O-Glycosyl and O-Phosphoryl-Proteins in Alkaline Solution, in: Protein Crosslinking-Nutritional and Medical Consequences (M. Friedman, ed.) Plenum Press, New York - London, p. 155

90. Whiting, A.H. (1971), Isolation of Lysinoalanine from the Protein-Polysaccharide Complex of Cartilage after Alkali Treatment, Biochim. Biophys. Acta 243, 332

91. Woodard, J.C., M.R. Alvarez (1967), Renal Lesions in Rats fed Diets containing Alpha Protein, Arch. Path. (Chicago) 84, 153

92. Woodard, J.C. (1969), On the Pathogenesis of Alpha Protein-Induced Nephrocytomegalia Laboratory Investigation 20 Nr. 1,9

93. Woodard, J.C., D.D. Short (1973), Toxicity of Alkali-Treated Soyprotein in Rats
J. Nutr. 103, 569

94. Woodard, J.C., D.D. Short, M.R. Alvarez, J. Reyniers (1975), Biological Effects of N^{ε}-DL-(2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine, Lysinoalanine,
in: Protein Crosslinking-Nutritional and Medical Consequences (M. Friedman, ed.) Plenum Press, New York - London, p. 595

95. Zak, F.G., H.J. Holzner, E.J. Singer, H. Popper (1960), Renal and Pulmonary Tumors in Rats fed Dimethylnitrosamine
Canc. Res. 20, 96

96. Ziegler, K. (1964), New Cross-links in Alkali-Treated Wool, J. Biol.Chem. 239, 2713

97. Ziegler, K., I. Melchert, C. Lürken (1967), $N\delta$-(2-amino-2-carboxyethyl)-ornithine, a New Amino Acid from Alkali-Treated Proteins
Nature 214, 404

Nachtrag:

98. v. Wangenheim, B. (1979), Über den Einfluß von ε-Fructoselysin auf die Tubulusepithelzellen der Rattenniere
Med. vet. Diss. München

Nach Beendigung meiner Arbeit möchte ich mich für die sehr guten Arbeitsbedingungen im Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. Erbersdobler gilt mein besonderer Dank für die jederzeit gewährte Förderung und Anregung meiner Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Osterkorn danke ich für die hilfsbereite und großzügige Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Bei Fräulein E. Lainer möchte ich mich für die Einführung in die Labortechnik bedanken.

L e b e n s l a u f

Anna Barbara Holstein, geb. Blunk

24.2.1952	als Tochter der Hausfrau Malene Blunk, geb. Behrens, und des Kaufmanns Dr. Klaus Blunk in Hamburg geboren
1958 - 1962	Besuch der Volksschule in Hamburg
1962	Umschulung auf das Gymnasium Willhöden, Hamburg-Blankenese
9.12.1970	Bestehen des Abiturs am Gymnasium Willhöden
SS 1971	Immatrikulation an der Freien Universität Berlin im Fachbereich Tiermedizin
SS 1973	Bestehen der Tierärztlichen Vorprüfung an der Freien Universität Berlin
WS 1973/74	Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Fachbereich Tiermedizin
24.2.1977	Staatsexamen, Tiermedizin
25.4.1977	Approbation als Tierärztin
1.5.1977	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München
9.9.1977	Heirat mit Frank Peter Holstein, Arzt
1.12.1977	Einstellung als wissenschaftliche Hilfskraft an oben genanntem Institut